

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Detekce nestinu ve tkáních

Detection of nestin in tissues

(diplomová práce)

Vedoucí práce: PhDr. Zdeňka Kudláčková, Ph.D.
Konzultant: prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“

Datum:

Podpis:

„Ráda bych poděkovala prof. MUDr. Jaroslavovi Mokrému, Ph.D, PhDr. Zdeňce Kudláčkové, Ph.D. a paní Haně Hollerové za odborné vedení, cenné rady a za příjemnou spolupráci při sestavování mé diplomové práce. Děkuji také mé rodině a přátelům za podporu a povzbuzení.“

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Michala Vařejčková

Vedoucí práce: PhDr. Zdeňka Kudláčková, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.

Název diplomové práce: Detekce nestinu ve tkáních

Cíl práce: Cílem této práce bylo pomocí imunohistochemických metod dokázat, že se intermediální filamentum nestin vyskytuje nejen v kapilárách, ale i ve velkých cévách - arteriích a vénách, což doposud nikdo nezveřejnil. Dále jsme sledovali koexpresi nestinu s proliferačním markerem PCNA.

Metody: Experimentální část spočívala ve vyšetření potkaních embryí o stáří 11 a 16 dnů odebraných z potkaních samic Wistar (VELAZ, Praha, Česká republika). Detekce exprese nestinu a PCNA byla provedena různými typy nepřímých imunohistochemických metod. Pro zesílení signálu detekce byl použit EnVision systém nebo biotinylovaný tyramid.

Hlavní poznatky: Endotel krevních cév exprimuje nestin různou intenzitou. V některých krevních cévách exprese nestinu chybí. S vyhráváním tkáně je nestin postupně nahrazován zvýšenou expresí jiného typu intermediálního filamenta. Pro identifikaci antigenů, které jsou ve tkáni vyjádřeny jen slabou intenzitou, se jeví optimální amplifikace signálu pomocí tyramidu.

Závěr: Výsledky této práce dokládají, že nestin není přítomen jen v angiogenních kapilárách, ale i ve velkých cévách - artériích a vénách. Úroveň exprese nestinu je vyšší v remodelovaných artériích než vénách. V artériích exprimují nestin jak buňky endotelové, tak buňky hladké svaloviny. Nestin hraje důležitou roli v arteriogenezi během remodelace cytoskeletu endotelových a hladkosvalových buněk.

Klíčová slova: nestin; krevní cévy; artérie; PCNA; imunohistochemie

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Michala Vařejčková

Supervisor: PhDr. Zdeňka Kudláčková, Ph.D.

Consultant: prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.

Title of thesis: Detection of nestin in tissues

Aim of the work: The aim of this study was to use immunohistochemical methods to show intermediate filament nestin occurs not only in the capillaries but also in large blood vessels - arteries and veins - which has not been published so far. We also investigated coexpression of nestin with a proliferating marker, PCNA.

Methods: All studies were performed using embryos 11 and 16 days old from Wistar rats (VELAZ, Prague, Czech Republic). Expression of nestin and PCNA was detected by various types of indirect immunohistochemical method. To amplify a specific signal, we used EnVision system or biotinylated tyramide.

Main results: Endothelium of blood vessels expressed nestin with a varying intensity. In some blood vessels expression of nestin was missing. In a developing tissue, nestin is gradually being replaced by increased expression of another type of intermediate filament. To identify tissue antigens that are expressed in a weak intensity, it is better to use signal amplification with tyramide.

Conclusion: The results of this study provide evidence that nestin is present not only in angiogenic capillaries but also in large blood vessels - arteries and veins. The level of nestin expression is higher in arteries than in remodeling veins. In arteries, nestin is expressed in both endothelial and smooth muscle cells. Nestin plays an important role in arteriogenesis during remodeling cytoskeleton of the vascular cells.

Key words: nestin; blood vessels; arteries; PCNA; immunohistochemistry

Seznam zkratek:

A	artérie
AEC	aminoethylcarbazol
AP	alaklická fosfatáza
BrdU	bromodeoxyuridin
BT	biotinylovaný tyramin
DAB	diaminobenzidin
DAPI	diaminofenylindol
GFAP	gliální fibrilární kyselé protein (glial fibrillary acidic protein)
IF	intermediální filamentum
IHCH	imunohistochemie
LSAB	biotinylovaný streptavidin (labelled streptavidin biotin)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk (proliferating cell nuclear antigen)
SA	streptavidin
SA - AP	streptavidin s navázanou alkalickou fosfatázou (alkaline phosphatase)
SA - HRP	streptavidin s navázanou křenovou peroxidázou (horseradish peroxidase)
SA -Cy3	streptavidin s navázaným chromogenem Cy3
V	véna

OBSAH:

1	ÚVOD	8
2	CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Cytoskelet.....	10
3.2	Intermediální filamenta	13
3.3	Nestin	17
3.4	Cévy	21
3.4.1	Anatomie cévní stěny.....	22
3.4.2	Kapiláry	22
3.4.3	Vény.....	23
3.4.4	Artérie	24
3.5	Imunohistochemie	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	Design experimentu	33
4.2	Charakteristika pokusných zvířat	33
4.3	Barvení jader a cytoplasmy	35
4.4	LSAB - HRP / LSAB - AP.....	35
4.5	LSAB - CSA	37
4.6	EnVision - HRP.....	37
4.7	Značení dělících se buněk pomocí BrdU	38
5	VÝSLEDKY	40
5.1	Vyhodnocení výsledků.....	40
6	DISKUZE	55
7	ZÁVĚR.....	58
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

1 ÚVOD

V současné době v ČR umírá ročně na nádorová onemocnění téměř 30 000 osob.

Včasná diagnostika těchto onemocnění zvyšuje šanci na přežití. V době stanovení diagnózy před zahájením onkologické léčby se provádí vyšetření nádorových markerů.

Za nádorové markery lze považovat i intermediální filamenta. Jedním z možných markerů, který by mohl sloužit pro diagnostiku nádorových onemocnění, je i nestin.

Přítomnost nestinu lze zaznamenat nejen v průběhu angiogeneze, ale i v průběhu časného vývoje kosterní svaloviny, v endotelu regenerujících cév po infarktu myokardu nebo v nezralých buňkách embryonální tkáně.

V této diplomové práci jsme zaměřili svou pozornost na výběr vhodných imuno-histochemických metod pro studium exprese nestinu v endotelových buňkách kapilár, kde se nestin vyskytuje, ale i ve velkých cévách - artériích a vénách, kde výskyt nestinu prozatím nikdo nepotvrdil.

2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vybrat vhodné tkáňové vzorky a vhodné detekční systémy k průkazu nestinu a k průkazu proliferujících buněk. Dalším cílem bylo provést a vyhodnotit expresi nestinu v krevních cévách a pomocí imunohistochemických metod dokázat, že se nestin vyskytuje nejen v kapilárách, ale i ve velkých cévách - artériích a vénách. Dalším záměrem bylo vyhodnotit expresi nestinu v proliferujících buňkách.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Cytoskelet

Cytoskelet neboli metaplasma tvoří vnitřní skelet eukaryotní buňky rozprostírající se v cytoplazmě. Cytoskelet je vysoce dynamická struktura, která se reorganizuje během změn tvaru buňky, dělení nebo reaguje na změny ve svém okolí. Je přímo odpovědný například za rozdělení chromozomů během mitózy, za stah buněk svalu (Alberts et al., 1998).

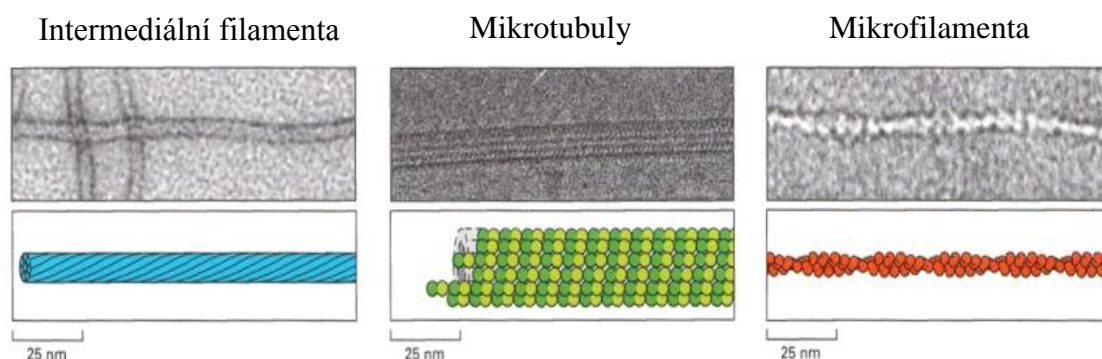
Mezi hlavní strukturální komponenty cytoskeletu patří mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediální filamenta (IF) (viz Obrázek č. 1). Tyto komponenty jsou morfologickým i funkčním základem řady specializovaných buněčných struktur (viz Tabulka č. 1).

Z chemického hlediska jsou všechny cytoskeletální struktury tvořeny pouze proteiny. Základním proteinem mikrotubulů je tubulin, základním proteinem mikrofilament je aktin. Základní proteiny IF tvoří několik druhů proteinů. Tubulin a aktin jsou globulární proteiny, které jsou schopny polymerizovat do mikrotubulů a mikrofilament, které mají danou tloušťku. Molekuly bílkovin IF mají charakter fibrilárních proteinů (Nečas et al., 1991).

Tabulka č. 1: Přehled základních komponent cytoskeletu (Nečas et al., 1991, upraveno)

Komponenta cytoskeletu	Průměr	Základní protein	Vybrané přidružené proteiny	Hlavní buněčné struktury
mikrotubuly	25 nm	tubulin (globulární, dimer, 2 x 50 kDa)	dynein kinezin	všechny eukaryontní buňky (cytoplazmatická síť, centrioly, mitotické vřeténko, kinocilie, neurotubuly)
mikrofilamenta	7 nm	aktin (globulární, 43 kDa)	profilin filamin myosin troponin α -aktin	všechny eukaryontní buňky (cytoplazmatická síť, mikroklky, kontraktilní prstenec, stresová vlákna)
intermediální filamenta	10 nm	cytokeratiny vimentin desmin gliální fibrilární kyselý protein neurofilamenta (fibrilární, přibližně 50 kDa)	synemin filagrin epinemin	buňky živočišné (cytoplazmatická síť, laminy jádra)

Obrázek č. 1: Molekulární struktura tří hlavních komponent cytoskeletu (Alberts et al., 1998, upraveno)



Na hlavní strukturální komponenty cytoskeletu jsou vždy připojeny jiné druhy proteinů - přidružené proteiny. Některé z těchto přidružených proteinů se podílejí na regulaci morfogeneze cytoskeletální soustavy tím způsobem, že ovlivňují polymeraci základních proteinů do mikrotubulů a mikrofilament nebo naopak jejich depolymeraci. Dále se podílejí na interakci těchto základních strukturálních komponent ve složitěji organizovaných cytoskeletálních strukturách (např. ve stresových vláknech), a tím umožňují jejich vznik a stabilitu. Další funkcí přidružených proteinů je tvorba spojek, které vážou cytoskeletální komponenty s jinými buněčnými strukturami. Některé přidružené proteiny se podílejí na mechanismu transformace chemické energie v pohybovou.

Cytoskelet má tři základní funkce: strukturní, pohybovou, informační.

I.Strukturní funkce

Cytoskelet je strukturou velmi dynamickou, rychle může vzniknout a rychle se opět zrušit, dává tvar buňce i jejím součástem - výběžky, určuje tvar jádra. Cytoskelet se podílí na připojení sousedních buněk pomocí mezibuněčných spojů. Dynamičnost cytoskeletu vyplývá z vlastností aktinu a tubulinu, které mohou snadno polymerizovat i depolymerizovat. Tubulin i aktin z depolymerizovaných buněčných struktur může být okamžitě použit ke tvorbě nových struktur. Každá buňka obsahuje v cytoplazmě zásoby nepolymerizovaného tubulinu a aktinu, a tím činí dynamickou přestavbu cytoskeletu nezávislou na metabolismu.

Mikrotubuly a mikrofilamenta tvoří výběžky buněk, které jsou velmi dlouhé (např. bičíky, řasinky, mikrokilky epitelových buněk, kontraktilní výběžky), a tedy musí mít mechanickou oporu.

II. Pohybová funkce

Všechny druhy pohybu - pohyb buňky nebo pohyby uvnitř buňky, jsou realizovány díky přítomnosti mikrotubulů a mikrofilament, která mají schopnost transformace chemické energie v energii pohybovou.

Z energetického hlediska je nejúčinnější systém myofilament spolu s přidruženými proteiny - systém aktin-myosin.

III. Informační funkce

Přenos informace je připisován účasti mikrotubulů - při příjmu některých mitogenních signálů povrchovými receptory buňky dochází ke změně rozmístění cytoplazmatických mikrotubulů.

Známa je také kontinuita centriolů a bazálních tělísek řasinek a bičíků při buněčném dělení. Obě struktury jsou tvořeny mikrotubuly a denzní nestrukturovanou hmotou a jsou podmínkou pro tvorbu dělicího vřeténka, resp. řasinek nebo bičíků (Nečas et al., 1991).

3.2 Intermediální filamenta

IF jsou vlákna o průměru asi 10nm, tvoří součást cytoskeletu a jsou nejpevnější a nejodolnější ze všech tří typů cytoskeletálních vláken.

Jejich hlavní funkcí je umožnit buňkám vydržet mechanické napětí (Alberts et al., 1998).

Od mikrotubulů a mikrofilament se liší několika charakteristickými rysy:

1. Existuje několik skupin základních bílkovin.
2. Proteiny IF je možno rozdělit do šesti základních skupin (vimentin, desmin, keratiny, gliální fibrilární kyselý protein, bílkoviny neurofilament, nestin) (viz Tabulka č. 2). V mnohobuněčném organismu je jejich exprese diferencována a odpovídá histogenetickému původu dané buňky nebo tkáně.
3. IF jsou více odolné vůči některým detergentům, ke kolchicinu a cytochalasinu B, které působí depolymerizaci mikrotubulů i mikrofilament (Nečas et al., 1991).

IF se nacházejí v cytoplazmě, v buněčném jádře se nacházejí laminy.

Cytoplazmatická IF se nacházejí v cytoplazmě většiny buněk a nejčastěji tvoří cytoplazmatickou síť, která obklopuje jádro. Odtud dosahují až k periférii buňky, kde jsou zakotveny do plasmatické membrány v místech mezibuněčných spojů. Tento typ filament se dělí do tří tříd: *keratinová filamenta* vyskytující se v epitelových buňkách, *vimentinová a vimentinu příbuzná filamenta* se nachází v buňkách pojivových tkání, ve svalových buňkách a podpůrných buňkách nervového systému (neurogliových buňkách), *neurofilamenta* se vyskytují v nervových buňkách. Jádrová IF vytvářejí dvojrozměrnou síť - jádrovou laminu, která vystýlá a zpevňuje vnitřní jadernou membránu všech eukaryontních buněk. IF v této jaderné lamině jsou tvořena třídou proteinů, zvaných laminy (Alberts et al., 1998).

Tabulka č. 2: Základní proteiny IF - jejich charakteristiky (Cooper et al., 2009, upraveno)

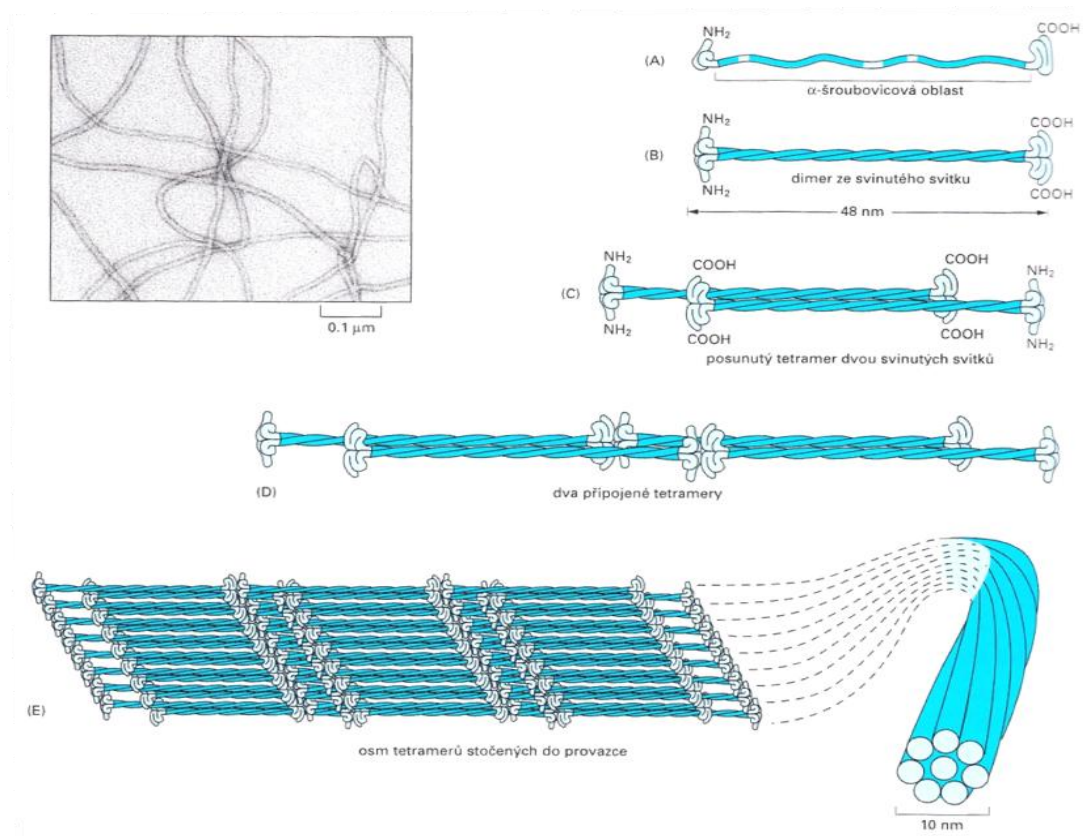
Typ	Protein	Molekulová hmotnost v kDa	Charakteristický výskyt ve tkáních (buněkách)
I	Kyselé keratiny (11 proteinů)	40-60	Epitelové buňky
II	Neutrální nebo bazické keratiny (8 proteinů)	50-70	Epitelové buňky
III	Vimentin Desmin Gliální fibrilární kyselý protein Peripherin	54 53 51 57	Fibroblasty, leukocyty, ...
IV	Neurofilamentární proteiny: NF-L NF-M NF-H α -internexin	 67 150 200 66	Neurony Neurony Neurony Neurony
V	Jádrové laminy	60-75	Jádrová lamina všech buněčných typů
VI	Nestin	200	Kmenové buňky - především CNS

Stavba intermediálních filament:

Centrální vláknitá část je tvořena α -šroubovicí, která je zakončena amino- a karboxylovou koncovou doménou, označované jako C- a N- koncové domény (viz Obrázek č. 2 (A)). Koncové domény jsou velmi variabilní co do aminokyselinného složení a celkové délky (Nečas et al., 1991).

Velmi důležitou funkcí koncových domén je interakce s ostatními složkami cytoskeletu (Alberts et al., 1998). Tyto domény odlišují jednotlivé proteiny IF v jejich délce a sekundárním uspořádání. Prvním stupněm uspořádání je tvorba dimerů ze dvou polypeptidových řetězců obtočených okolo sebe (viz Obrázek č. 2 (B)). Diméry se pak spojují antiparalelně a vytvářejí tetramery (viz Obrázek č. 2 (C)), jejichž konce se vzájemně propojují a vytvářejí protofilamenta (viz Obrázek č. 2 (D)). V dalším kroku se spojuje asi osm protofilamentů a vytváří tak vláknitou strukturu (viz Obrázek č. 2 (E)). Vzhledem k antiparalelnímu uspořádání je celková struktura apolární (Nečas et al., 1991).

Obrázek č. 2: Stavba IF (Alberts et al., 1998)



3.3 Nestin

IF nestin je cytoplazmatický protein.

Nestin poprvé identifikoval Lendahl, Zimmerman a McKay (Lendahl et al., 1990). Jeho název je zkratkou z anglického *neuroepithelial stem cell protein*.

Expresi nestinu lze pozorovat u kmenových/progenitorových buněk izolovaných z kostní dřeně (Vogel et al., 2003), škály (Toma et al., 2001), střev (Wiese et al., 2003), vlasových váčků (Li et al., 2003), slinivky břišní (Zulewski et al., 2001) a dalších tkání.

Expresi nestinu se objevila i v krevních cévách zásobujících CNS (Tohyama et al., 1992; Frisén et al., 1995), nádory (Tohyama et al., 1992; Dahlstrand et al., 1992; Kim et al., 2002; Sugawara et al., 2002) a vyvíjející se myši končetiny (Mokrý et Němeček, 1998). Expresi nestinu se prokázala v buňkách mozkových cév během prenatalního a časně postnatálního vývoje potkana, zatímco endotelové buňky cév mozku dospělých potkaních jedinců vykazovaly expresi nestinu velmi zřídka (Mokrý et Němeček, 1998a; Mokrý et Němeček, 1998b).

Další místa, kde byla pozorována exprese nestinu:

Krevní cévy lidského plodu

Pomocí imunohistochemie byly znázorněny všechny krevní cévy v choriových klcích, nestin pozitivní endotelové buňky ohraničovaly lumen cévy, zatímco buňky mezenchymové pojivové tkáně, cytotrofoblast a syncytiotrofoblast nevykazovaly žádný signál. Nestin - imunoreaktivní krevní cévy byly zaznamenány v embryonální tkáni - v oblastech pojivové tkáně zahrnující škaru a pouzdro obklopující rostoucí orgány, včetně perichondria obklopující chrupavčitý základ kosti. Dokonce i endotelové buňky krevních cév, vyživujících rostoucí orgány (srdce, plíce, játra, ledviny), exprimují nestin. Mezi třetím a čtvrtým měsícem intrauterinního vývoje klesla exprese nestinu v endotelových buňkách krevních cév a začal vývoj jednotlivých orgánů. V pátém měsíci byla většina krevních cév nestin negativní.

Krevní cévy žlutého tělíska v dospělém ženském organismu

Nestin pozitivní endotelové buňky artérií a vén byly objeveny ve vazivových septech a v záhybech stěny žlutého tělíska tvořené theca luteiními buňkami. Krevní cévy se větvaly a tvořily menší větve a kapiláry, které vstoupily do oblasti, která je tvořena granulosa luteiními buňkami. Všechny endotelové buňky krevních cév různého kalibru exprimovaly nestin v cytoplazmě. Jádro imunopozitivní buňky nevykazovalo imunoreaktivitu. Nebyl pozorován rozdíl v intenzitě exprese nestinu mezi artérií, vénou a kapilárou. Silná imunoreaktivita byla zaznamenána u endotelových buněk lemujících lumen cévy, zatímco slabý signál se objevil v tunica media v buňkách hladké svaloviny. Nicméně, buňky pojivových tkání zůstaly nestin negativní.

Regenerující cévy u infarktu myokardu

Byla provedena imunohistochemická detekce na vzorcích myokardu osob, které zemřeli na infarkt myokardu.

Zachované, popřípadě regenerující části byly vaskularizovány nestin pozitivními cévami. Nestin pozitivní krevní cévy se nacházely ve tkáni přilehlé nekrotické oblasti. V některých místech tkáně se objevily nestin pozitivní krevní kapiláry rostoucí na omezenou vzdálenost i k nekrotické tkáni. Pozitivita nebyla omezena jen na kapiláry, ale exprese nestinu vykazoval i endotel arterií a venul. Všechny endotelové buňky novotvořených kapilár obsahovaly ve své cytoplazmě nestin. Exprese nestinu byla pozorována i v kardiomyocytech, zatímco všechny buňky pojivové tkáně byly nestin negativní. K detekci proliferujících buněk byl použit proliferativní marker PCNA. Většina kardiomyocytů byla PCNA negativní.

Krevní cévy solidního nádoru

Růst solidního nádoru je závislý na řádné vaskularizaci. Nestin byl pozorován v méně diferencovaných mozkových nádorových buňkách, v reaktivních astrocytech, a také v krevních cévách různého kalibru. Exprese nestinu byla pozorována i v maligním melanomu kůže, kde pozitivitu vykazovaly nádorové buňky (Mokrý et al., 2004).

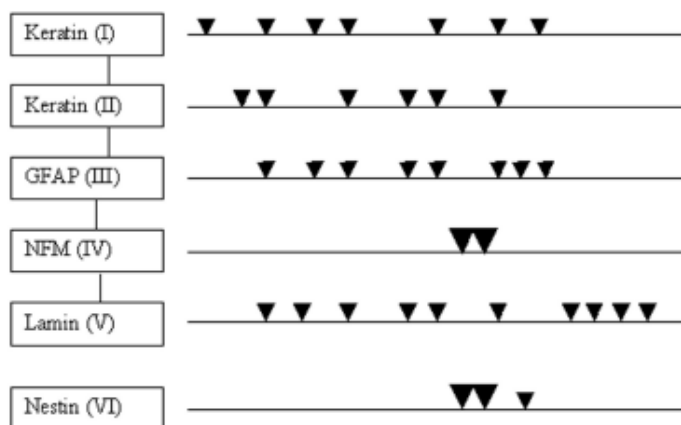
Stavba a vlastnosti nestinu

Zařazení nestinu do VI. skupiny IF vychází ze struktury genu - z uspořádání intronů a exonů. Umístění prvních dvou intronů je stejné jako u neurofilament (viz Obrázek č. 3). Avšak další intron je napojený vždy stejnou nukleotidovou částí, tím se nestin odlišuje od ostatních IF.

Nestin je velký protein tvořený více než 1600 aminokyselinami. C-koncovou doménu tvoří 1306 aminokyselin. V porovnání s jinými IF, je N- koncová doména nestinu kratší (Dahlstrand et al., 1992).

V porovnání s jinými živočišnými druhy, je lidský nestin kratší o 187 aminokyselin než potkaní a o 203 aminokyselin než myši (Dahlstrand et al., 1992; Yang et al., 2001). Rozdílná délka je způsobena změnou v počtu C-koncových domén opakujících se jednotek.

Obrázek č. 3: Schematické znázornění rozmístění intronů vybraných proteinů IF (Michalczyk et Ziman; 2005)



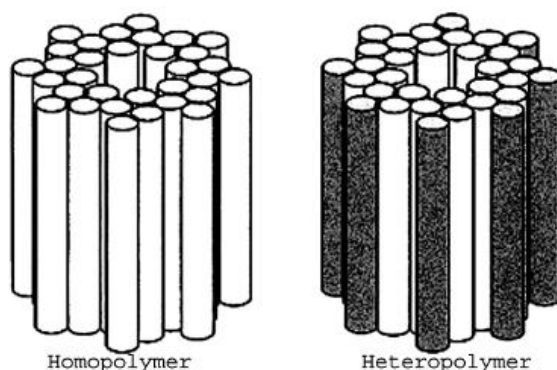
Nestin přednostně tvoří IF spojením s různými IF, např. s vimentinem, α -internexinem (Marvin et al., 1998; Eliasson et al., 1999; Steinert et al., 1999). Takto spojená IF vytváří spíše heterodimery a heterotetramery než homodimery pravděpodobně proto, že nestin obsahuje velmi krátké N-koncové domény, které mají zásadní význam pro uspořádání filament (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann and Aebi, 2000). Heterodimery složené z nestinu - vimentinu a nestinu - α -internexinu jsou stabilnější než homodimery

nestinu, ale méně stabilní než homopolymery vimentinu a α -internexinu (Steinert et al., 1999). Heteropolymery tvořené nestinem a vimentinem, popř. nestinem a α -internexinem se připojují k jádru homopolymerů tvořených pouze vimentinem (viz Obrázek č. 4). Dlouhé C-koncové domény nestinu vyčnívají z tohoto útvaru a propojují nebo vytváří spojovací můstek mezi IF, mikrofilamenty a mikrotubuly (viz Obrázek č. 5). Proto nestin může řídit změny v buněčné dynamice (Hirokawa et al., 1984; Hisanaga and Hirokawa, 1988; Herrmann and Aebi, 2000).

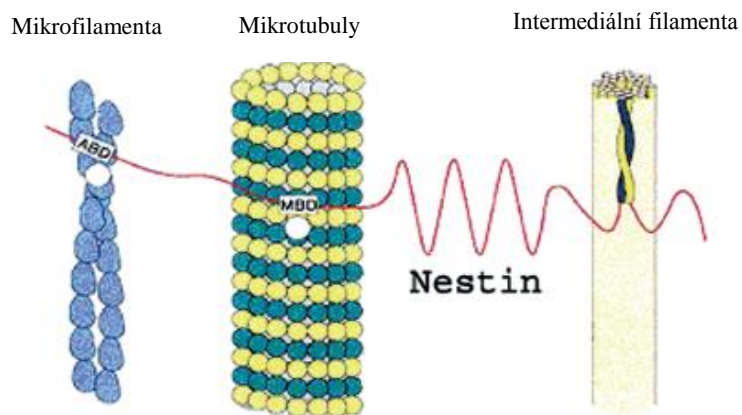
Spolu s vimentinem se podílí na průběhu mitózy - během interfáze se takto vytvořené polymery rozpínají z perinukleární oblasti k buněčnému povrchu; při přechodu z profáze do metafáze vytváří nestin a vimentin síťovitou strukturu kolem buněčného jádra; během telofáze je takto vytvořená síť rozrušena (Chou et al., 2003; Sahlgren et al., 2003). Během mitózy, vzrůstá fosforylace nestinu, vimentinu až dvojnásobně, to vše se děje při reorganizaci filamentózní sítě (Sahlgren et al., 2001).

Fosforylace nestinu může regulovat nejen polymerizaci s proteiny intermediálních filament III. a IV. typu, ale může také měnit vazby s dalšími složkami cytoskeletu, upravovat jak sestavení tak rozpojení IF uvnitř supramolekulárních struktur, a tak řídit dynamické změny v uspořádání cytoskeletu (Steinert et al., 1999; Herrmann and Aebi, 2000; Sahlgren et al., 2003; Hirokawa et al., 1984). Bylo prokázáno, že fosforylace reguluje prostorové uspořádání proteinů IF, např. vimentinu (Chou et al., 1989, 1990). Rozpojení IF vimentinu během mitózy vyžaduje přítomnost a fosforylaci jak nestinu, tak i vimentinu, ale není vlastností všech buněk, neboť řada buněčných typů nestin neexprimuje (Chou et al., 2003).

Obrázek č. 4: Jednotlivé proteiny IF tvořící homopolymery a heteropolymery (Michalczyk et Ziman; 2005)



Obrázek č. 5: Schematické znázornění interakce mezi mikrofilamenty, mikrotubuly a IF (Michalczyk et Ziman; 2005)



3.4 Cévy

Cévy - soustava cévní - je bohatý soubor trubic různého kalibru, vystlaných jednou vrstvou plochých endotelových buněk a těmito trubicemi proudí tekutina.

Dle protékající tekutiny se cévní soustava dělí v soustavy dvě: soustava cév krevních a cév mízních.

Soustava krevních cév spojuje orgány a tkáně celého těla, vede krev, čímž dodává živiny a kyslík a zprostředkovává látkovou přeměnu ve tkáních. Ze tkání odvádí oxid uhličitý a další zplodiny látkové přeměny. Krví jsou také transportovány hormony ze žláz s vnitřní sekrecí (Čihák et al., 2004).

Známe tři hlavní typy krevních cév: kapiláry (vlásečnice), vény (žíly), artérie (tepny) (Marieb et Mallat, 2005).

3.4.1 Anatomie cévní stěny

Stěna všech typů cév je složena ze tří základních vrstev:

Tunica intima (vnitřní) - tvoří ji vrstva endotelových buněk, které lemují vnitřní povrch cévy a vrstva subendotelová (Konrádová et al., 1998). Díky tomuto povrchu je sníženo tření krve při jejím proudění cévou (Marieb et Mallat, 2005). Mohou se zde vyskytovat i buňky hladké svaloviny. V okolí jádra endotelových buněk se vyskytují i elementy cytoskeletu - IF a aktinová mikrofilamenta. Buňky endotelové vrstvy spočívají na bazální lamině. Subendotelovou vrstvu tvoří řídké kolagenní vazivo (Konrádová et al., 1998).

Tunica media (střední) - je tvořena cirkulárně orientovanými vrstvami buněk hladké svaloviny (Marieb et Mallat, 2005). Její součástí jsou elastická a retikulární vlákna. Někdy se elastické struktury hromadí na hranicích t. media a vytvářejí struktury (membrana elastica interna a membrana elastica externa), které tuto vrstvu oddělují od t. intima a od t. externa (Konrádová et al., 1998).

Tunica externa (vnější) - tvoří ji pojivová tkáň, obsahující kolagenní a elastická vlákna, která jsou uspořádána longitudinálně (Marieb et Mallat, 2005). Nachází se zde i fibroblasty a adipocyty (Konrádová et al., 1998). Tato vrstva chrání cévu, zesiluje její stěnu a zakotvuje ji do okolních tkání (Marieb et Mallat, 2005).

3.4.2 Kapiláry

Stavba kapilár

Stěnu kapilár tvoří jedna vrstva endotelových buněk, obklopených bazální membránou. V tenkých výběžcích endotelových buněk se nachází pinocytotické vezikuly, které zajišťují transcelulární transport různých látek.

Na různých místech se podél kapilár a malých venul nachází pericyty. Jedná se o buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými obklopují

endotelové buňky. Pericyty ve své cytoplazmě obsahují aktin, myosin a tropomyosin, což ukazuje, že tyto buňky mohou být schopny kontrakce (Konrádová et al., 1998).

Průsvit kapilár kolísá v rozmezí 7 - 9 μm . Jejich délka se pohybuje mezi 0,25 - 50 mm (Janqueira et al., 1992).

Kapiláry se vytvářejí z prekapilár, které díky své histologické stavbě stojí na pomezí mezi arteriolou a kapilárou. Větve prekapilár tvoří již pravé kapiláry. Na začátku každé kapiláry se nachází v místě přechodu z prekapiláry vrstva buněk hladké svaloviny, označovaný jako prekapilární svěrač. Tento svěrač reguluje průtok krve tkáněmi dle aktuální potřeby kyslíku a živin (Marieb et Mallat, 2005).

Dle struktury endotelových buněk a charakteru jejich bazální laminy lze kapiláry rozdělit na *souvislé* - somatické s kontinuální výstelkou (nefenestrované), *fenestrované* - viscerální, fenestrace jsou uzavřeny diafragmou, *fenestrované* bez diafragmy, *sinusoidy* (Janqueira et al., 1992; Martínek et Vacek, 2009).

Funkce kapilár

Kapiláry jsou propustnou bariérou pro kyslík, oxid uhličitý a produkty látkové přeměny. Také plní metabolické funkce - endotelové buňky metabolizují velké množství látek (např. odbourávají lipoproteiny, konvertují prostaglandiny, atd.). Kapiláry mají protisrážlivou funkci - zabraňují kontaktu krevních destiček a vaziva, a tím brání vzniku trombů (Dylevský et al., 2000).

3.4.3 Vény

Stavba vén

Tunica externa vény bývá obvykle silnější než tunica media. Ve stěnách vén je menší množství elastinu než v artériích, protože vény nemusí tlumit pulsace, ke kterým dochází během rytmických kontrakcí srdce.

Nejmenší vény, venuly, mají průměr 8-100 μm . Nejmenší venuly, tzv. postkapilární venuly, jsou složeny z endotelu a přilehlých pericytů. Funkce těchto venul je podobná kapilárám (Marieb et Mallat, 2005).

Průměr malých a středních vén je 1-9 mm. Tyto cévy tvoří tunica intima, jejíž součástí je endotel a tenká subendotelová vrstva, tunica media obsahující buňky hladké svaloviny, retikulární a elastická vlákna, a tunica externa, kde jsou kolagenní vlákna a buňky hladké svaloviny.

Velké vény jsou cévy s průměrem větším než 9 mm. Jejich struktura se mění v závislosti na umístění cévy v organismu. Tunica intima těchto cév sestává z endotelu a subendotelové vrstvy. Tunica media je tenká a obsahuje jen několik vrstev buněk hladké svaloviny, naproti tomu je zde více vazivové tkáně. Tunica externa tvoří nejtlustší vrstvu stěny velkých vén.

V malých a středně velkých vénách se nacházejí chlopně - valvulae venosae. Chlopně jsou sestaveny ze dvou poloměsíčitých záhybů intimy tvořené elastickou vazivovou tkání, kterou po obou stranách lemuje endotel (Konrádová et al., 1998).

Funkce vén

Vény zajišťují návrat krve z kapilár do pravé srdeční předsíně. Tyto krevní cévy představují rezervoár asi 70% objemu veškeré krve. Chlopně, jež jsou součástí vén, usměrňují proud krve a chrání žíly před nadměrným namáháním žilní stěny vysokým hydrostatickým tlakem (Dylevský et al., 2000).

3.4.4 Artérie

Stavba artérií

Artérie lze rozdělit dle průměru na arterioly, artérie malého a středního kalibru a artérie velkého kalibru.

Průměr arterioly je menší než 0,5 mm. Tunica intima je utvářena vrstvou endotelových buněk a velmi tenkou subendotelovou vrstvou. Tunica media sestává z jedné až pěti vrstev hladkých svalových buněk. Tunica externa je velmi tenká.

Artérie malého a středního kalibru jsou zpravidla artériemi svalového typu. Tunica intima je tvořena buňkami endotelovými a subendotelovou vrstvou, ta je silnější. Tunica media obsahuje, v závislosti na průměru cév, někdy až 40 vrstev hladkosvalových

buněk. Jsou zde i elastická a retikulární vlákna. Tunica externa sestává z longitudinálně uspořádaných kolagenních a elastických vláken, nachází se tu i fibroblasty a adipocyty. Ve stěnách těchto artérií jsou i vasa vasorum.

Artérie velkého kalibru jsou artériemi elastického charakteru. Tunica intima těchto cév je silnější než v artériích svalového typu. Je zde tlustá subendotelová vrstva, buňky hladké svaloviny, retikulární vlákna a elastické blanky, které se nazývají membranae fenestratae. Tunica externa je tenká, obsahuje elastická a kolagenní vlákna (Konrádová et al., 1998).

Funkce artérií

Artérie jsou rozděleny na dva typy dle funkce, kterou vykonávají: vývodné a distribuční. Vývodné artérie neboli *artérie elastického typu* jsou trubice většího kalibru. Tyto artérie rozvádějí krev směrem od srdce do celého těla. Stěna těchto tepen vyrovnává tlakové rozdíly, které vznikají při srdeční systole a diastole. Směrem k periférii klesá tlak i rychlost krevního proudu. Distribuční artérie, někdy označované jako *artérie svalového typu*, jsou trubice středního kalibru a rozvádějí krev k jednotlivým orgánům.

Pomocí tunica media řídí krevní zásobení orgánů. Ovlivňují i krevní tlak, ale pouze tehdy, jestliže dochází ke kontrakci nebo relaxaci většího počtu tepen (Dylevský et al., 2000).

3.5 Imunohistochemie

Imunohistochemie (IHCH) je obor, který vychází z imunochemie, jenž se zabývá chemickým hlediskem imunitních reakcí - vzájemné působení antigenu a protilátky, a pomocí histologických barvicích metod umožňuje detekci antigenů pomocí specifických protilátek.

Místo, kde došlo k vazbě mezi antigenem a protilátkou, se musí zobrazit vhodným ukazatelem.

První práce, popisující IHCH, vyšla v roce 1941. Tato publikace zveřejňuje zavedení protilátky značené fluoresceinem (Coons et al., 1941). Dalším krokem ve vývoji IHCH bylo v roce 1961 zavedení protilátky konjugované s feritinem (Singer et Schick,

1961). Takto značená molekula protilátky má využití pro elektronovou mikroskopii. Z hlediska IHCH je významný i rok 1966, kdy byla zavedena protilátka značená křenuvou peroxidázou (HRP) (Nakane et Pierce, 1966; Avrameas et Uriel, 1966). **Köhler a Milstein (1975)** zavedli hybridomovou technologii, která umožňuje produkovat téměř neomezené množství monoklonálních protilátek vysoké afinity.

V současné době je k dispozici obrovské množství monoklonálních i polyklonálních protilátek a vzhledem ke zdokonalování IHCH metod vzrostla i citlivost detekčních systémů.

Potřeba identifikovat nižší a nižší množství tkáňových antigenů vedla k sestavení velmi citlivých detekčních systémů založených na imunologických nebo neimunologických interakcích.

Citlivost detekčního systému závisí na množství značených molekul. Z tohoto důvodu je dnes nahrazeno používání přímých metod - s využitím přímo značených primárních protilátek - metodami nepřímými.

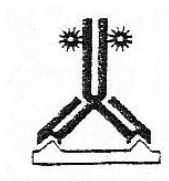
Imunohistochemické metody:

A. Přímá metoda

Tato metoda je založena na reakci přímo značené protilátky (např. fluorochromem, HRP, alkalickou fosfatázou (AP)) (černá) s tkáňovým nebo buněčným antigenem (bílá) (Coons et al., 1941; Nakane et Pierce, 1966; Singer et Schick, 1961) (viz Obrázek č. 5).

Metoda je velmi rychlá, ale vzhledem k tomu, že pracuje pouze s jednou protilátkou, která váže jen omezené množství markerů, je velmi málo citlivá.

Obrázek č. 5: Princip přímé metody (Mokrý, 1996).



B. Nepřímé metody

Tyto metody vylučují nutnost použití chemicky konjugovat primární protilátku.

V prvním kroku metody reaguje neznačená specifická protilátka (primární protilátka) s antigenem. Primární protilátka se chová jako antigen, který v dalším kroku identifikuje značenou protilátkou (sekundární protilátka) - anti-imunoglobulin.

Sekundární protilátka musí pocházet z jiného živočišného druhu (např. z kozy), ale musí směřovat proti primární protilátce. Použití sekundární protilátky umožňuje detekci celé škály sekundárních monoklonálních nebo polyklonálních protilátek (Mokrý, 1996; Lukáš et al., 1997; Beranová et Tonar, 2002).

Nepřímé metody jsou citlivější než přímé, protože vazbou sekundární protilátky se do místa výskytu antigenu vnese větší množství značených molekul.

I. Běžné nepřímé metody

Dvoustupňová nepřímá metoda

V prvním kroku se antigen váže se specifickou protilátkou (primární protilátka) (černá) (Bosman et Nieuwenhuijzen-Kruseman, 1979). Ve druhém kroku je primární protilátka vázána další protilátkou (sekundární protilátka) - označená (bílá) (viz Obrázek č. 6A) (Mokrý, 1996; Beranová et Tonar, 2002; Lukáš et al., 1997)

Třístupňová nepřímá metoda

Tato metoda navazuje na dvoustupňovou nepřímou metodu. Protilátka aplikována ve třetím kroku, je namířena proti označené sekundární protilátce (bílá), a je proto označována jako terciární protilátka (šedá) (Boenisch, 1989). Sekundární i terciární protilátka musí být konjugovány se stejným enzymem (viz Obrázek č. 6B).

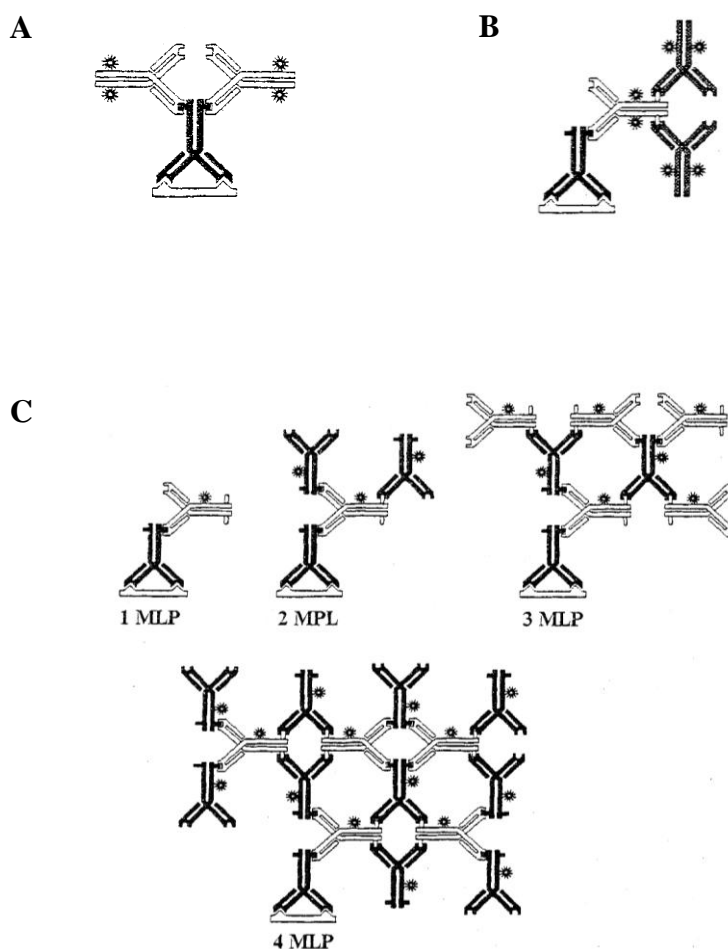
Metoda umožňuje detekovat relativně nízkou hladinu antigenů nebo antigenů s omezeným počtem epitopů (Mokrý, 1996; Beranová et Tonar, 2002; Lukáš et al., 1997)

MLP metoda (Multi-Layered Peroxidase-Labelled Antibody)

Nejdříve (1MLP) je na sledovaný antigen aplikována primární neznačená protilátka a poté sekundární značená protilátka. V dalším kroku (2 MLP) je aplikována terciární značená protilátka pocházející ze stejného živočišného druhu jako primární protilátka a je namířena proti sekundární protilátce. V následujícím kroku (3 MLP) se použije stejná sekundární protilátka a poté (4MLP) je opět přidána ta stejná terciární protilátka (viz Obrázek č. 6C) (Mokrý, 1996).

Díky postupnému přidávání značených protilátek dochází k maximálnímu zesílení signálu.

Obrázek č. 6: Principy běžných nepřímých metod (Mokrý, 1996).



II. Metody využívající protilátky vázající enzymy

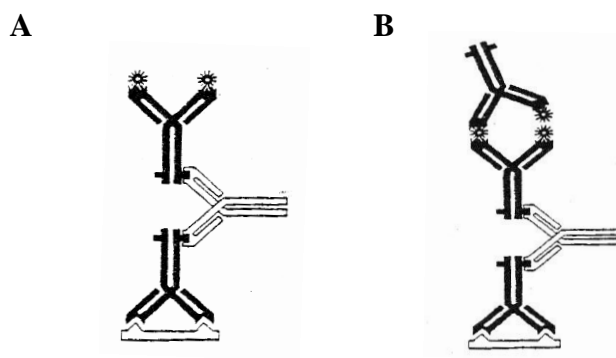
PAP metoda (Peroxidase Anti-Peroxidase)

Nejdříve se na antigen (bílá) váže primární protilátka (černá) a následně se aplikuje sekundární neznačená protilátka (bílá). Volná místa na sekundární protilátce vážou PAP komplex, který obsahuje tři molekuly HRP (hvězdy) a dvě protilátky proti HRP (černá) (ty pochází ze stejného živočišného druhu jako primární protilátka) (viz Obrázek č. 7A) (Mokrý, 1996; Beranová et Tonar, 2002; Lukáš et al., 1997).

APAAP metoda (Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase)

Sekundární protilátka (bílá) váže jak primární protilátku (černá), tak i protilátku vázající AP (černá + hvězdy) (viz Obrázek č. 7B) (Mokrý, 1996; Beranová et Tonar, 2002; Lukáš et al., 1997).

Obrázek č. 7: Principy metod využívajících protilátky vázající enzymy (Mokrý, 1996).



III. Metody založené na interakci biotin-avidin

BRAB metoda (Bridged Avidin-Biotin)

Primární protilátkou (černá) je vázána sekundární protilátka (bílá), která je biotinylovaná. Avidin spojuje biotinylovanou protilátku s biotinylovaným merkerem (např. HRP) (tečkovaný tetramer) (viz Obrázek č. 8A) (Mokrý, 1996).

ABC metoda (Avidin-Biotin Complex)

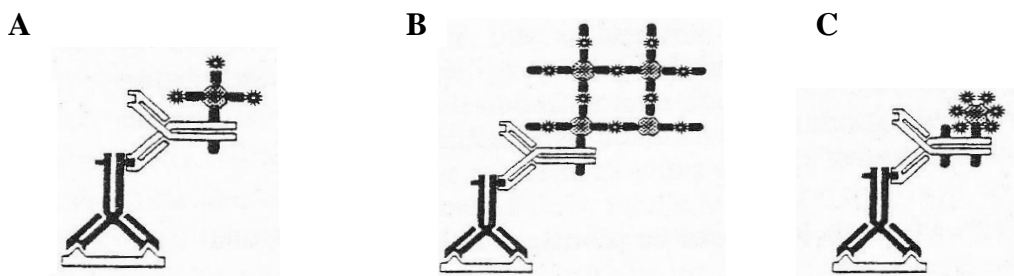
Každá značená molekula (např. HRP) nese několik molekul biotinu, které s molekulami avidinu tvoří ABC komplex. Volná vazebná místa slouží k vazbě sekundární biotinylované protilátky (viz Obrázek č. 8B) (Mokrý, 1996; Beranová et Tonar, 2002; Lukáš et al., 1997).

LAB metoda (Labelled Avidin-Biotin)

Sekundární protilátka je biotinylovaná (bílá). V tomto případě váže avidin (tečkovaný tetramer) až šest molekul merkeru (např. HRP) (hvězdy) (viz Obrázek č. 8C) (Mokrý, 1996; Beranová et Tonar, 2002; Lukáš et al., 1997).

Ve všech metodách lze místo avidinu použít i streptavidin. Taková metoda se pak označuje jako LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin).

Obrázek č. 8: Principy metod založených na interakci biotin-avidin (Mokrý, 1996).



IV. Metody využívající ve vodě rozpustné polymerní kojugáty

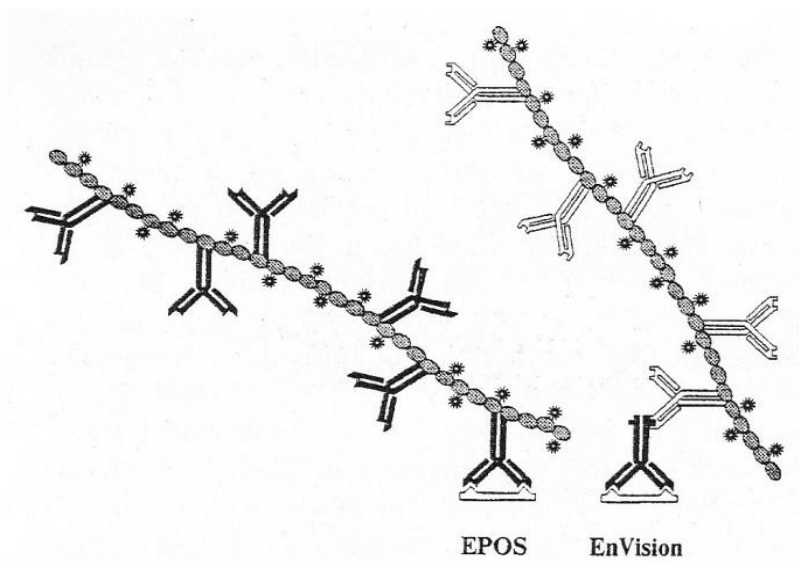
EPOS metoda (Enhanced Polymer One-Step Staining)

Tato metoda využívá polymerů s vysokou molekulovou hmotností spojených s velkým počtem specifických protilátek (černá) a označených molekul (hvězdy) (viz Obrázek č. 9) (Mokrý, 1996).

EnVision metoda

Antigen je rozpoznán primární protilátkou (černá) a k zesílení signálu dochází po použití polymeru, který nese molekuly markeru a sekundární protilátky namířené proti primární protilátce (bílá) (viz Obrázek č. 9) (Mokrý, 1996).

Obrázek č. 9: Principy metod využívajících ve vodě rozpustné polymerní konjugáty (Mokrý, 1996).



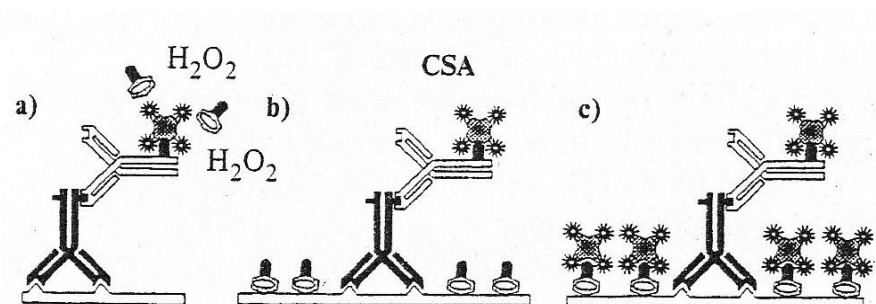
V. Amplifikační systémy

CSA metoda (Catalyzed Signal Amplification)

Tato metoda umožňuje další zesílení signálu detekčních systémů využívajících HRP (např. LSAB).

Biotin, spojený se sekundární protilátkou, se váže s komplexem streptavidin-HRP. Biotinylovaný tyramin (BT) se aktivuje přidáním H_2O_2 (Obrázek č. 10_a). Molekuly aktivovaného BT se usazují na proteiny nacházejícími se v bezprostřední blízkosti antigenů (viz Obrázek č. 10_b). Zesílení signálu se dosáhne přidáním molekul avidinu označených HRP (viz Obrázek č. 10_c). Takto označené molekuly se vážou na volná místa biotinu.

Obrázek č. 10: Principy CSA metody (Mokrý, 1996).



4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Design experimentu

Zaměřili jsme se na rostoucí tkáň, kde jsme očekávali remodelaci nebo tvorbu nových cév. Experiment bylo nutné provést ve tkáních, které jinak neměly nestin pozitivní buňky. Proto byly připuštěny potkaní samice, abychom mohli odebírat placenty, děložní rohy, embrya nebo embrya v plodovém obalu. V těchto vyvíjejících se tkáních jsme mohli pozorovat expresi nestinu.

Tkáň, které byly součástí experimentu, se odebraly potkaním samicím v hluboké anestezii. Po celkové laparotomii bylo zvíře utraceno vykrvácením.

Pro detekci BrdU bylo nutné zvířatům aplikovat thymidinový analog před odběrem tkáňových vzorků.

Pro IHCH jsme používali metody nepřímé - trojstupňové na bázi LSAB, což umožňovalo použít klasický enzym nebo fluorochrom, které jsme případně ještě dále zesílili metodou EnVision nebo CSA.

Při zavádění metody LSAB - CSA jsme provedli detekci GFAP ve fétálním mozku, protože GFAP je jedním z nejstabilnějších markerů a jeho detekce sloužila zároveň jako kontrola.

Další metodu jsme zavedli při průkazu proliferačních buněk. Teprve po vyladění této detekce jsme ji aplikovali na řezy obsahující nestin pozitivní buňky.

4.2 Charakteristika pokusných zvířat

Tkáň pro histologické vyšetření byla získána z potkaních samic Wistar o hmotnosti 350g (VELAZ, Praha, Česká republika).

Samicím byl aplikován thymidinový analog bromodeoxyuridin (BrdU) (i.p. 1-2 ml/100 g) (Amersham Biosciences, UK).

Po krytí byly samice odděleny od samců. 11. a 16. den březosti byly samice utraceny v pentobarbitalové nekróze (s.c. pentobarbital 5 mg/100 g) (Sigma, UK).

Po celou dobu studie měla zvířata volný přístup k vodě a potravě.

Experimenty provedené v této studii byly schváleny lokální etickou komisí při Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Odebrané tkáně byly fixovány neutrálním formalínem a po dehydrataci zality do parafínu. Z bločků se nakrájely řezy o tloušťce 5 μm . Po odparařování se na některých řezech zvýraznila jádra a cytoplasmy pomocí hematoxylinu a eosinu, jiné řezy se promyly v destilované vodě (2x5 minut), následně se ponořily do citrátového roztoku a vystavily se působení mikrovlnného záření (3x5 minut), po kterém došlo k revitalizaci epitopů. Poté následoval oplach v destilované vodě (2x5 minut) a v PBS (3x5 minut). Následovala další úprava řezů pro jednotlivé metody a účely (viz pracovní postupy jednotlivých metod).

Použité primární protilátky:

myší monoklonální protilátka anti-nestin (Rat-401) (ředění 1:4) (DSHB, USA)

myší monoklonální protilátka anti-PCNA (ředění 1:250) (Immunotech S. A., Francie)

myší monoklonální protilátka anti-BrdU (Bu20a) (ředění 1:50) (Dako, Dánsko)

myší monoklonální protilátka anti-GFAP (ředění 1:400) (Sigma, USA)

Použitá sekundární protilátka:

oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-myší (ředění 1:250) (Jackson IR, USA)

Příprava roztoků:

Citrátový pufr:

9 ml roztoku A (kyselina citrónová 21,01 g, destilovaná voda 1000 ml), 41 ml roztoku B (citronan sodný 29,41 g, destilovaná voda 1000 ml), 450 ml destilované vody

PBS (phosphate buffered saline) pufr:

8,76 g NaCl, 0,2 g KCl, 7,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , 1000 ml destilované vody

TBS (TRIS (trishydroxymethylaminometan) buffered saline)) pufr:

25 ml roztoku A (TRIS 24,23g, destilovaná voda 1000 ml), 8 ml roztoku B (HCl 10 ml, destilovaná voda 1000ml), 67 ml destilované vody

Roztok carbocyaninu (Cy3):

1 ml Amplification diluent, 10 μ l Cy3 (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo), 5 μ l H₂O₂

4.3 Barvení jader a cytoplasmy

Po odparafinování se řezy obarvily roztokem hematoxylinu pro zvýraznění jader, následoval oplach pod tekoucí vodou, a poté se řezy vložily do eosinu pro zvýraznění cytoplasmy. Po oplachu v destilované vodě se provedlo odvodnění řezů xylenem a vzestupnou alkoholovou řadou. Nakonec se řezy zamontovaly do bezvodého montovacího média (Merc, Německo).

Pracovní postup (LF HK, Ústav histologie a embryologie, IHCH laboratoř, 2011):

- | | |
|---|------------|
| 1. barvení jader | 5 minut |
| 2. oplach tekoucí vodou | 10 minut |
| 3. barvení cytoplasmy | 5 minut |
| 4. oplach v destilované vodě | 5 minut |
| 5. odvodnění - xylén | 3x1 minuta |
| 6. odvodnění - aceton | 5 minut |
| 7. odvodnění - etanol 70% | 5 minut |
| 8. odvodnění - etanol 80% | 5 minut |
| 9. odvodnění - etanol 96% | 5 minut |
| 10. montování řezů do bezvodého montovacího média | |

4.4 LSAB - HRP / LSAB - AP

Po revitalizaci epitopů se řezy propláchly v 5,5 % H₂O₂ pro utlumení endogenní peroxidázové aktivity. Následovalo promytí řezů v PBS a aplikace normálního oslího

séra (Jackson IR, USA) pro zablokování nespecifických vazebných míst. Po 15 minutách se sérum odstranilo a aplikovala se primární myší monoklonální protilátka anti-nestin. Po 12 hodinové inkubaci s primární protilátkou se řezy promyly v PBS, a poté se aplikovala oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-myší. Následoval oplach v PBS, aplikace streptavidinu - HRP (SA - HRP) (Dako, Dánsko). Po oplachu v PBS se k vizualizaci použil roztok aminoethylcarbazolu (AEC) (AEC 4,00 mg, dimethylformamid 4 kapky, 0,2 M kyselina octová 1,5 ml, 0,2 M octan sodný 3,5 ml, H₂O₂ 50 µl, destilovaná voda 10 ml), příležitostně se použil roztok diaminobenzidinu (DAB) (DAB 4 mg, dimethylformamid 4 kapky, PBS 10 ml, H₂O₂ 5 µl).

V případě metody LSAB - AP nebylo potřeba tlumit endogenní peroxidázovou aktivitu. Po aplikaci oslí sekundární biotinylované protilátky anti-myší následovala aplikace SA s navázanou alkalickou fosfatázou (SA - AP) (Sigma, USA). Po oplachu TBS se preparáty vložily do tmavé komůrky, následně se aplikoval Fast Red TR/Naphtol AS - MX (připravený dle návodu výrobce) (Sigma, USA) ke zviditelnění detekce. Vyvíjení signálu se průběžně kontrolovalo pomocí mikroskopu. Nakonec se skla zamontovala do pufrovaného glycerínu (Daipath, Itálie).

Pracovní postup (LF HK, Ústav histologie a embryologie, IHCH laboratoř, 2011):

- | | |
|---|-------------|
| 1. promytí v 5,5 % H ₂ O ₂ | 3x10 minut |
| 2. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 3. normální oslí sérum | 15 minut |
| 4. myší protilátka anti-nestin | 12 hodin |
| 5. oplach v PBS / TBS | 3x5 minut |
| 6. oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-myší | 45 minut |
| 7. oplach v PBS / TBS | 3x5 minut |
| 8. SA - HRP (SA - AP) | 45 minut |
| 9. oplach v PBS (TBS) | 3x5 minut |
| 10. AEC (DAB) / Fast Red TR/Naphtol AS-MX | 15-30 minut |
| 11. montování řezů do pufrovaného glycerínu | |

4.5 LSAB - CSA

Po vystavení řezů mikrovlnnému záření se aplikoval 5,5 % roztok H_2O_2 pro utlumení endogenní peroxidázy. Dále se aplikovala primární myší monoklonální protilátka anti-nestin (anti-GFAP), oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-myší a SA - HRP. Poté se na preparáty nakapal H_2O_2 a přidal se biotinylovaný tyramid (BT). V dalším kroku jsme na řezy nakapali roztok SA - Cy3 (Sigma, USA) a řezy vložili do tmy. Po inkubaci následoval oplach v destilované vodě. Pro zvýraznění buněčných jader jsme na řezy nakapali roztok diamidinophenylindolu (DAPI) (Sigma, USA) (5 minut ve tmě). Nakonec jsme řezy montovali do pufrovaného glycerínu (Daipath, Itálie).

Pracovní postup (LF HK, Ústav histologie a embryologie, IHCH laboratoř, 2011):

- | | |
|---|------------|
| 1. promytí v 5,5 % H_2O_2 | 3x10 minut |
| 2. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 3. normální oslí sérum | 15 minut |
| 4. myší protilátka anti-nestin (anti-GFAP) | 12 hodin |
| 5. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 6. oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-myší | 45 minut |
| 7. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 8. SA - HRP | 45 minut |
| 9. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 10. H_2O_2 + BT | 10 minut |
| 11. SA - Cy3 | 15 minut |
| 12. oplach v destilované vodě | 5 minut |
| 13. DAPI | 5 minut |
| 14. oplach v destilované vodě | 5 minut |
| 15. montování řezů do pufrovaného glycerínu | |

4.6 EnVision - HRP

Po utlumení endogenní peroxidázy 5,5 % H_2O_2 , následoval oplach v PBS a aplikace normálního oslího séra. Poté se řezy nechaly 12 hodin inkubovat s primární myší

protilátkou anti-PCNA. Po oplachu v PBS se aplikoval EnVision systém (Dako, USA) pro zesílení signálu detekce. Po oplachu v PBS se použil roztok DAB pro zviditelnění detekce. Po odvodnění řezů se skla zamontovala do bezvodého montovacího média (Merc, Německo).

Pracovní postup (LF HK, Ústav histologie a embryologie, IHCH laboratoř, 2011):

- | | |
|---|-------------|
| 1. promytí v 5,5% H ₂ O ₂ | 3x10 minut |
| 2. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 3. normální oslí sérum | 15 minut |
| 4. myší protilátka anti-PCNA | 12 hodin |
| 5. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 6. EnVision systém | 30 minut |
| 7. oplach PBS | 3x5 minut |
| 8. DAB | 10-30 minut |
| 9. oplach v destilované vodě | 2x5 minut |
| 10. odvodnění řezů | 5 minut |
| 11. montování řezů do bezvodého montovacího média | |

4.7 Značení dělicích se buněk pomocí BrdU

Po oplachu v destilované vodě a PBS následovala aplikace HCl (0,2 mol/l) pro rozštěpení nukleoproteinového komplexu. Po utlumení endogenní peroxidázy 5,5 % H₂O₂ a oplachu v PBS se aplikovalo normální oslí sérum (Jackson IR, USA). Po 12 hodinové inkubaci s primární myší monoklonální protilátkou anti-BrdU následoval oplach v PBS, aplikace oslí sekundární anti-myší biotinylované protilátky. Následoval oplach v PBS, aplikace SA - HRP (Dako, Dánsko) a opětovné promytí řezů v PBS. Pro zviditelnění detekce se použil roztok DAB a následně 5 % CuSO₄.5H₂O. Nakonec se preparáty dobarvily světlou zelení, poté následovalo odvodnění a montování preparátů do bezvodého montovacího média (Merc, Německo).

Pracovní postup (LF HK, Ústav histologie a embryologie, IHCH laboratoř, 2011):

- | | |
|---|---------------|
| 1. rozštěpení nukleoproteinového komplexu | 30 minut |
| 2. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 3. promytí v 5,5 % H ₂ O ₂ | 3x10 minut |
| 4. oplach v PBS | 2x5 minut |
| 5. normální oslí sérum | 15 minut |
| 6. myší protilátka anti-BrdU | 12 hodin |
| 7. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 8. oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-myší | 45 minut |
| 9. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 10. SA - HRP | 45 minut |
| 11. oplach v PBS | 3x5 minut |
| 12. DAB | 10 - 30 minut |
| 13. oplach v destilované vodě | 2x5 minut |
| 14. oplach v modré skalici | 5 minut |
| 15. oplach v destilované vodě | 2x5 minut |
| 16. dobarvení světlou zelení | 2 minuty |
| 17. odvodnění řezů | 5 minut |
| 18. montování řezů do bezvodého montovacího média | |

5 VÝSLEDKY

5.1 Vyhodnocení výsledků

Použitý materiál

Expresi nestinu a dalších markerů jsme pozorovali ve tkáni dělohy, placenty a embryí odebraných z potkaních samic Wistar o gestačním věku 11 a 16 dnů.

Děloha a placenta jsou rostoucí tkáně, jejich růst je spojený s vytvářením nových buněk a nových cév. Jedná se tedy o situaci, kde jsme očekávali, že by se mohl objevit nestin. U dospělých jedinců tkáně nerostou, nestin se tam tedy neobjevuje. Vlastní embrya jsme použili jako kontrolní tkáň obsahující nezralé tkáně - vyvíjející se tkáně např. neurální a svalové, které sloužily jako pozitivní kontrola.

Srovnání metodik

Při peroxidázové IHCH jsme se obávali vzniku pozadí způsobeného pseudoperoxidázovou aktivitou. Z toho důvodu jsme prováděli nezávislou detekci s použitím AP a imunofluorescence.

Novotvořené buňky jsme odlišili dle exprese proliferačních markerů (PCNA, BrdU). Abychom tuto mnohdy slabou pozitivitu mohli porovnat s lokalizací nestinu, použili jsme metody pro zesílení signálu - EnVision, případně LSAB - CSA. Výhodou použití těchto metod, vedle zesílení signálu, bylo, že jsme je mohli využít k současné kolokalizaci obou signálů, tj. pro simultánní detekci nestinu a PCNA v jednom řezu.

Výběr kombinace těchto antigenů jsme mohli zvolit z toho důvodu, že PCNA se nachází v jádře a nezamaskuje signál v cytoplazmě, kde je nestin.

Vyhodnocení získaných snímků

Pozorovali jsme různé typy cév - nejvyšší intenzita positivity na nestin je na okrajích děložních rohů, protože tyto nejvíce rostou. Endotel velkých cév vykazuje imunoreaktivitu na nestin jen příležitostně - endotel arterie a buňky hladké svaloviny tunica media jsou nestin pozitivní, zatímco endotel vén imunopozitivitu vykazuje zřídka (Obrázek č. 13 a 14), pro zviditelnění signálu byl použit Fast Red TR/Napthol AS-MX. U artérií drobnějšího průsvitu je celé lumen lemováno nestin pozitivními buňkami;

přestože endotel věny tvoří souvislá vrstva buněk, pozitivitu vykazují jen některé buňky, proto jsou světlejší; kapiláry děložních rohů mají všechny endotelové buňky nestin pozitivní, jedná se o novotvořené cévy, proto je exprese signálu intenzivnější (Obrázek č. 14).

Buňky hladké svaloviny, podpůrné vazivo typu myofibroblastů a endotelové buňky kapilár jsou nestin pozitivní (Obrázek č. 15).

Hlavní tkáň placenty (trofoblast) nevykazuje pozitivitu na nestin, všechny endotelové buňky artérií jsou silně imunoreaktivní (Obrázek č. 16), aktivita endogenní peroxidázy byla utlumena H_2O_2 .

Nejvyšší imunopozitivitu vykazuje neuroepitel vyvíjející se míchy, nestin pozitivní jsou i velké vyvíjející se cévy, plodové obaly imunopozitivitu nevykazují (Obrázek č. 17).

Jádra endotelových buněk artérie a věny jsou PCNA pozitivní (Obrázek č. 18a). Jádra PCNA se neobarvila DAPI, sraženina DAB signál pohltila, proto se při fluorescenci neznázorní (Obrázek č. 18b).

PCNA pozitivní jádra jsme nacházeli i uvnitř arterioly, buňky trofoblastu nejsou nestin pozitivní, myofibroblasty vykazují pozitivitu na nestin i PCNA (Obrázek č. 19a). Pravidelně jsme nestin nacházeli v arteriolách, a to ve dvou vrstvách - souvisle v endotelu a v cirkulárně uspořádaných buňkách hladké svaloviny odpovídající vrstvě tunica media (Obrázek č. 19b).

Aby byly vidět oba signály (exprese nestinu a PCNA) při proložení obou fotografií, musel se vrchní obraz zprůhlednit, a po sumaci signálu v Adobe Photoshop došlo k poklesu intenzity (Obrázek č. 19c). Na předchozích snímcích lze míru intenzity ověřit (Obrázek č. 19a a 19b). Pro lepší znázornění odlišné exprese nestinu a PCNA jsme PCNA pozitivním jádrům endotelových buněk artérie přiřadili zelenou barvu (Obrázek č. 19d).

Paralelně jsme provedli průkaz na GFAP - typický marker nervové tkáně, který je jedním z nejstabilnějších markerů (Obrázek č. 20). Tuto detekci jsme současně použili pro zavedení metody LSAB - CSA.

BrdU jsme prokázali v dělicích se buňkách trofoblastu a příležitostně i v buňkách endotelových (Obrázek č. 21). Detekci BrdU jsme provedli z důvodu zpřesnění časové informace o dělení buněk a také z důvodu zavedení nové metody.

Obrázek č. 11: Přehledné barvení hematoxylinem a eosinem.

Gestační věk 11 dnů. Embryo ještě není vyvinuto, lze pozorovat děložní stěnu a formující se placentu.

Amniotické dutiny (★), remodelující se bohaté cévní zásobení (—→).

Měřítko: 2,5 mm.

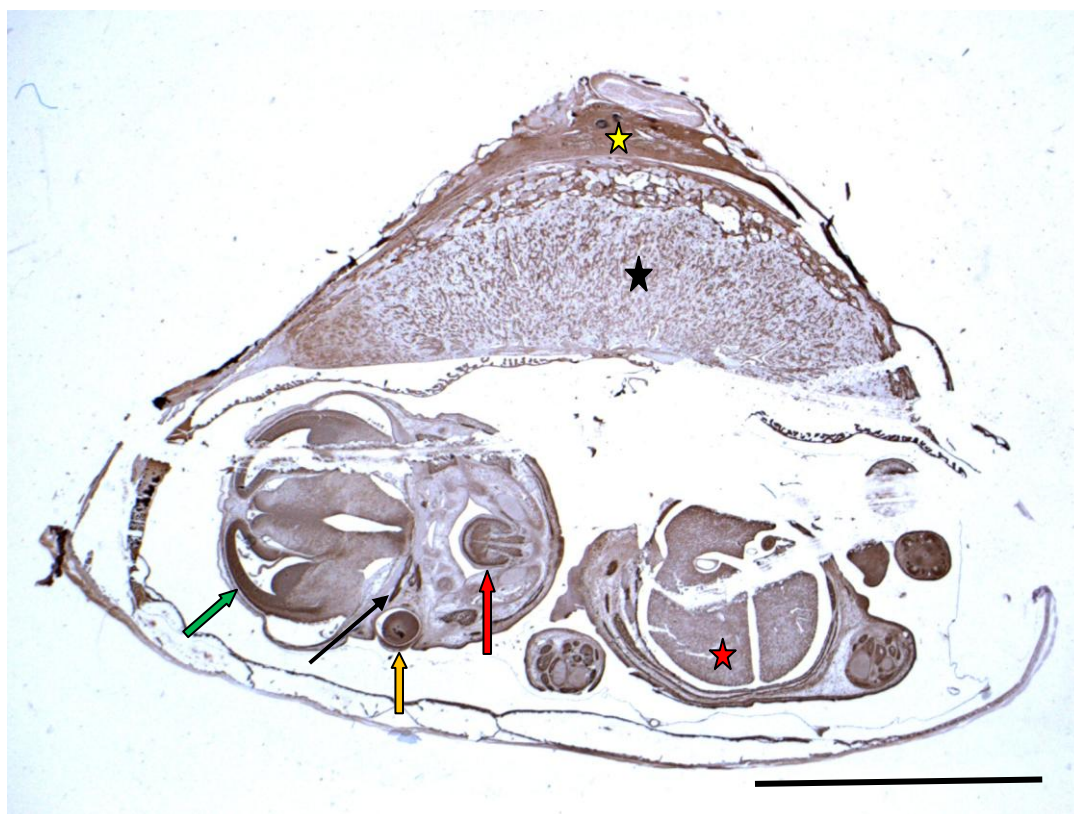


Obrázek č. 12: Embryo o stáří 16 dnů v plodových obalech.

Detekce nestinu pomocí systému LSAB - HRP. Reakce se vizualizovala DAB.

Děloha (★), placenta s nestin pozitivními cévami (★), stěna předního mozku bohatá na nestin pozitivní buňky (→), vyvíjející se okohybné svaly (→), oko (→), nestin pozitivní svalovina jazyka (→), hřbetní mícha (★).

Měřítko: 4 mm

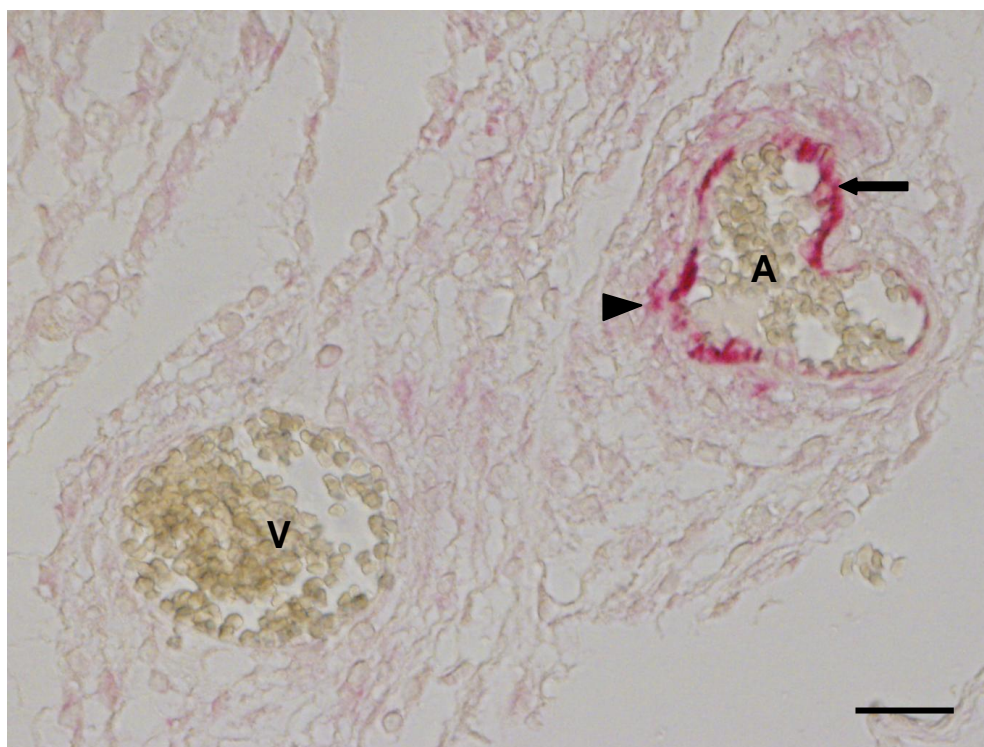


Obrázek č. 13: Detail dvou hlavních cév v děložní stěně pregnantní samice potkana.

Gestační věk 11 dnů. Detekce nestinu pomocí systému LSAB - AP.

Endotel artérie (➡), buňky hladké svaloviny tunica media (▶), artérie (A), vena (V).

Měřítko: 50 μ m.

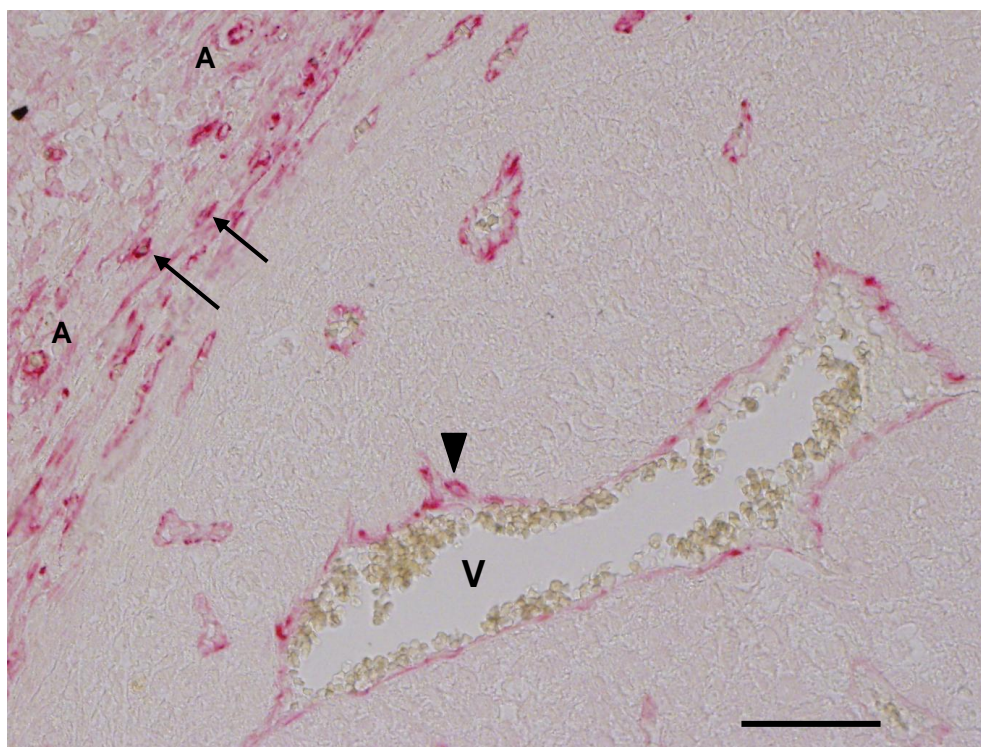


Obrázek č. 14: IHCH detekce nestinu v děložním rohu pregnantní samice potkana.

Gestační věk 11 dnů. K detekci se použil systém LSAB - AP.

Endotelové buňky kapilár (→), endotelové buňky vény (▼), artérie (A), vena (V).

Měřítko: 250 μ m.

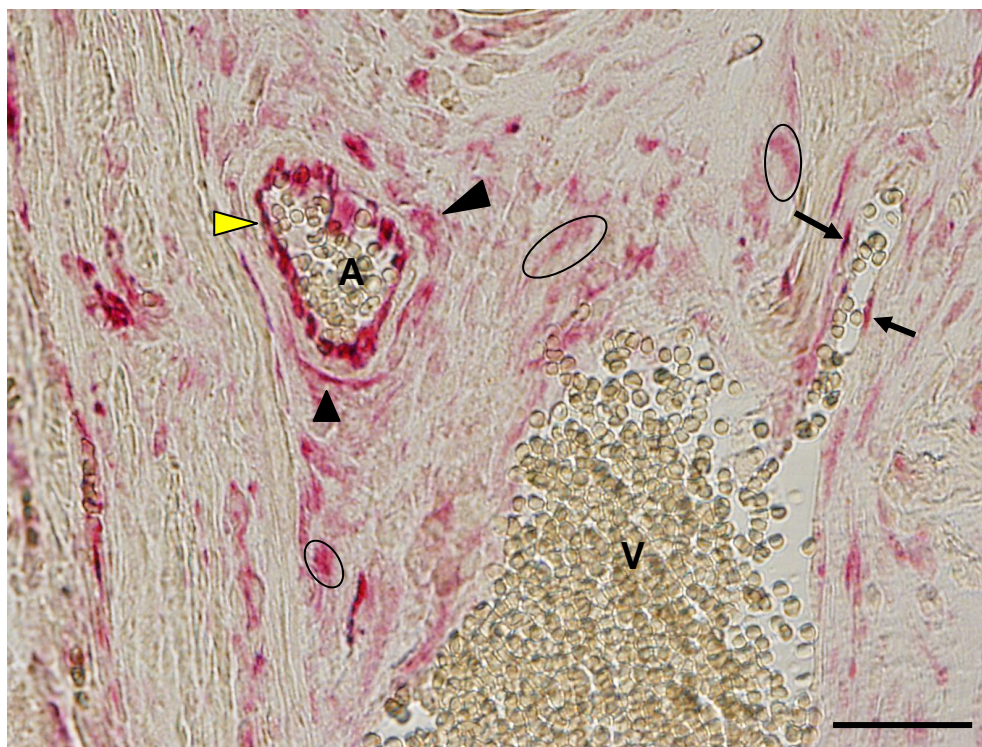


Obrázek č. 15: Odlišná imunoreaktivita endotelu vény a kapiláry.

Děložní stěna pregnantní samice potkana. Gestační věk 11 dnů. Detekce nestinu se provedla pomocí systému LSAB - AP.

Buňky hladké svaloviny (►), endotel artérie (▶), myofibroblasty (○), endotelové buňky kapiláry (→), artérie (A), vena (V).

Měřítko: 250 μm .



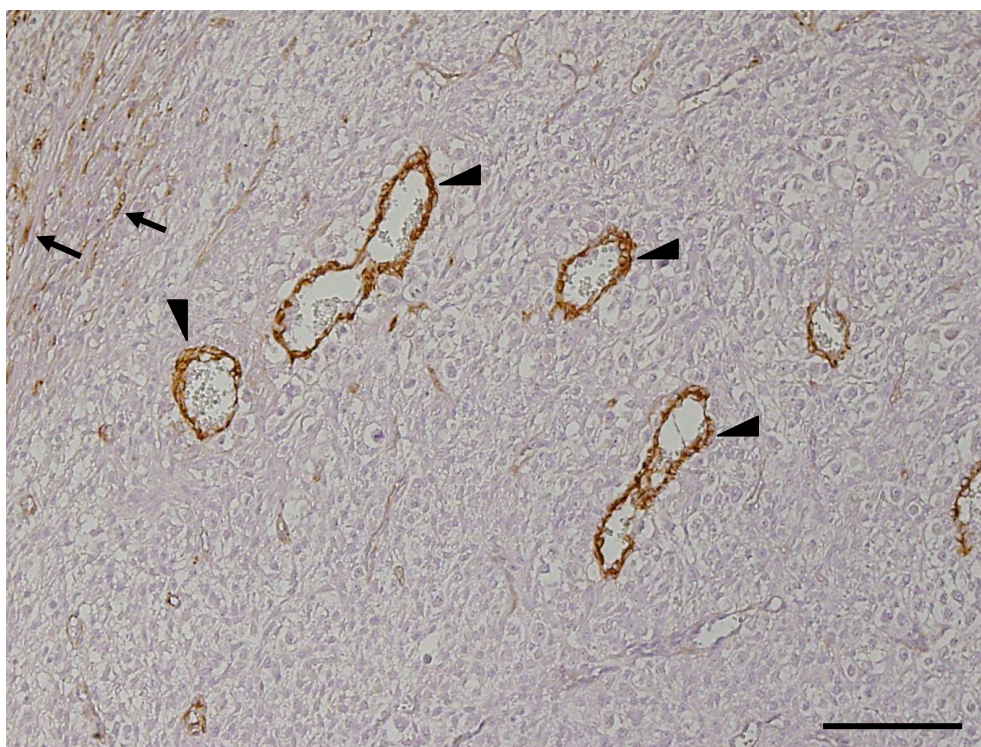
Obrázek č. 16: Silná imunopozitivita v artériích v děložní stěně pregnantní samice potkana.

Gestační věk 11 dnů. IHCH detekce nestinu se provedla pomocí systému LSAB - HRP.

Reakce se vizualizovala pomocí DAB.

Kapiláry (→), endotelové buňky artérií (▶).

Měřítko: 250 μ m.

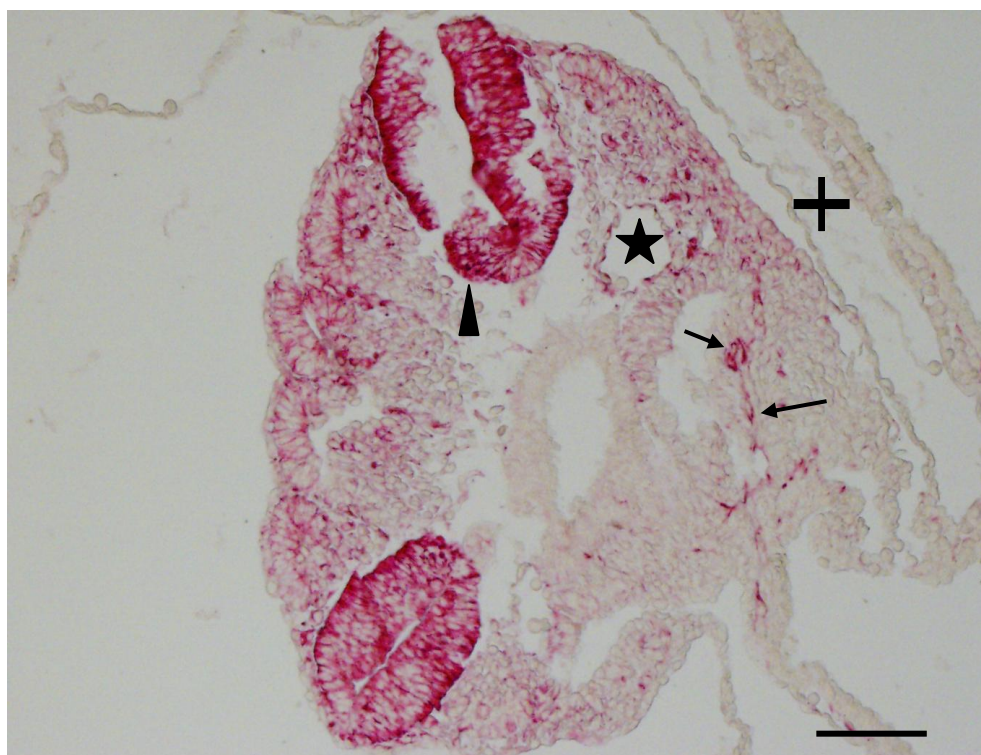


Obrázek č. 17: Exprese nestinu ve vyvíjející se míše.

Gestační věk 11 dnů. K detekci se použil systém LSAB - AP.

Neuroepitel (►), vyvíjející se kapiláry (—→), velká vyvíjející se céva (★), plodové obaly (+).

Měřítko: 500 μ m.

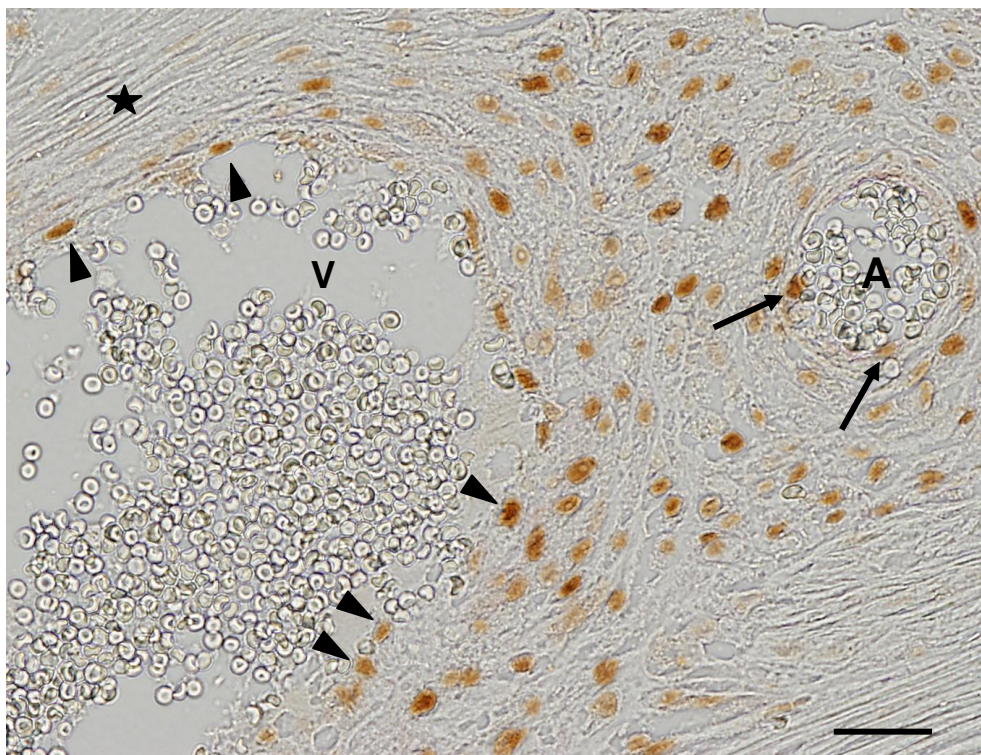


Obrázek č. 18a: Detekce PCNA v děložním rohu pregnantní samice potkana.

Gestační věk 11 dnů. Použitý detekční systém - EnVision - HRP.

Jádra endotelových buněk artérie imunoreaktivní na PCNA (→), jádra endotelových buněk vény imunoreaktivní na PCNA (►), oblast buněk bez exprese PCNA (★), artérie (A), vena (V).

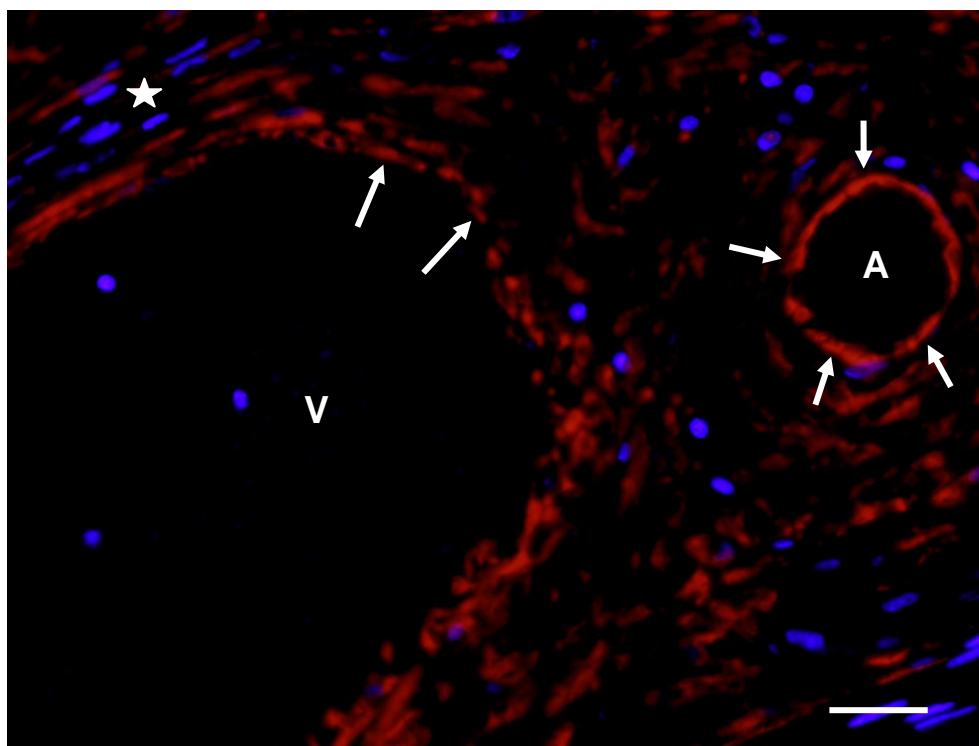
Měřítko: 50 µm.






Obrázek č. 18b: Imunofluorescenční detekce nestinu v děložním rohu pregnantní samice potkana.



Gestační věk 11 dnů. Zesílení imunoreaktivity pomocí systému LSAB - CSA. Cytoplasma nestin pozitivních endotelových buněk artérie (\Rightarrow), oblast s buňkami obarvenými DAPI (☆) (odpovídá oblasti bez PCNA viz Obrázek č. 18a), artérie (A), vena (V).

Měřítko: 50 μ m.



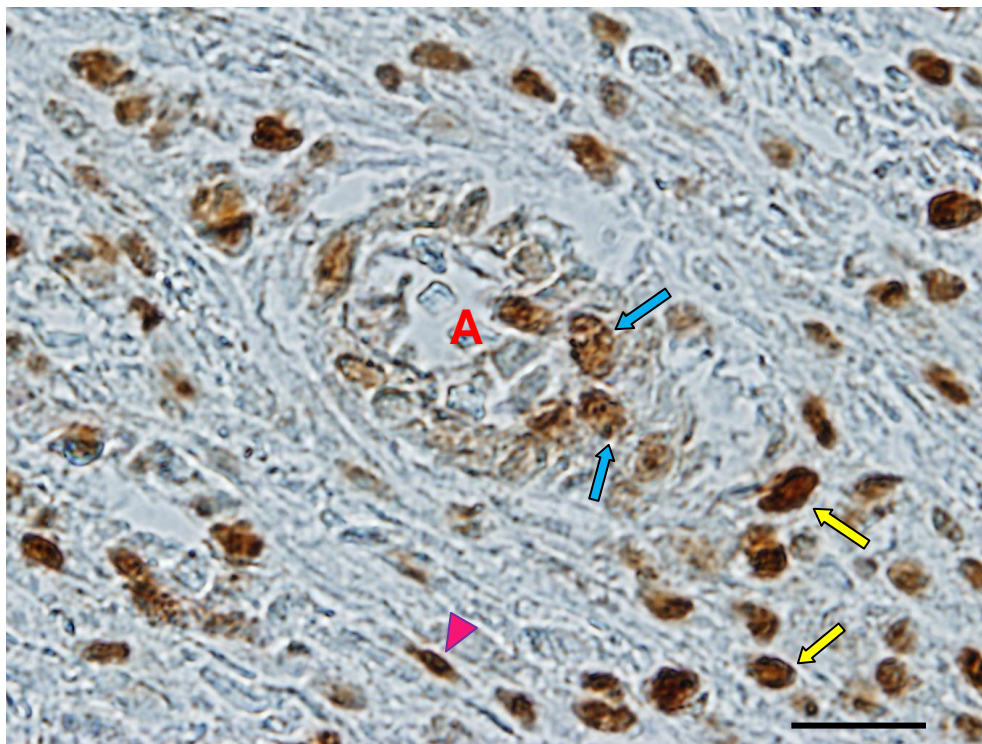
Obrázek č. 19a a 19b: Detail arterioly v děložním rohu pregnantní samice potkana.

Gestační věk 11 dnů. Použité detekční systémy - EnVision - HRP a LSAB - CSA. PCNA pozitivní jádra uvnitř arterioly (), jádro myofibroblastu (), jádra buněk trofoblastu ().

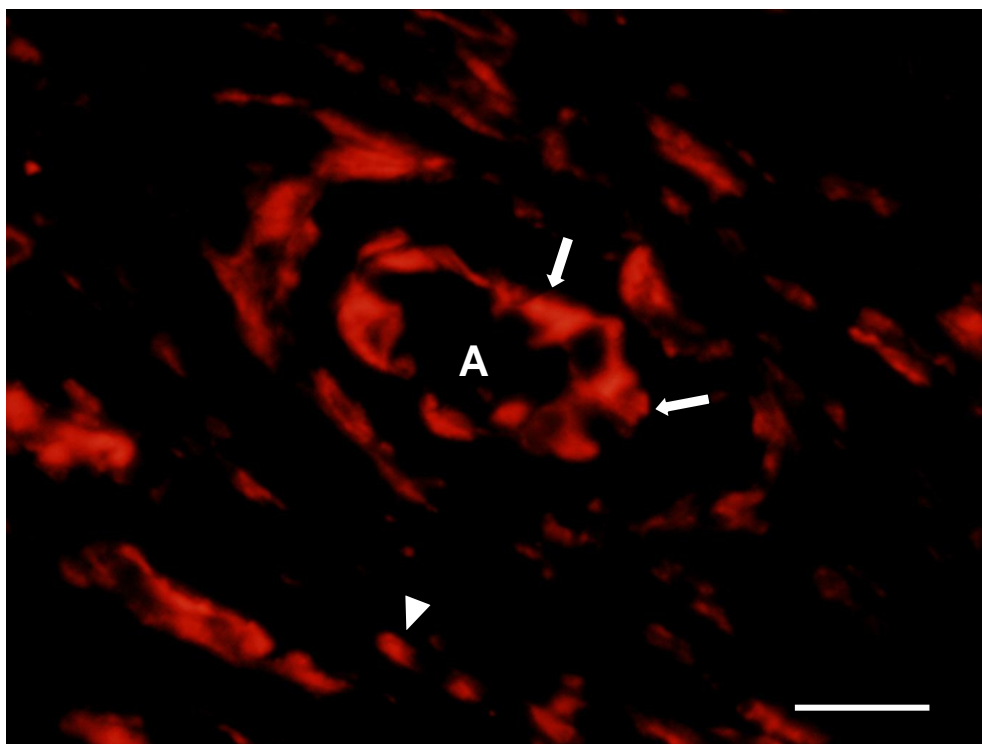
Cytoplasma nestin pozitivních endotelových buněk arterioly (), nestin pozitivní cytoplasma myofibroblastu (). Arteriola (A).

Měřítko: 40 μm .

19a



19b

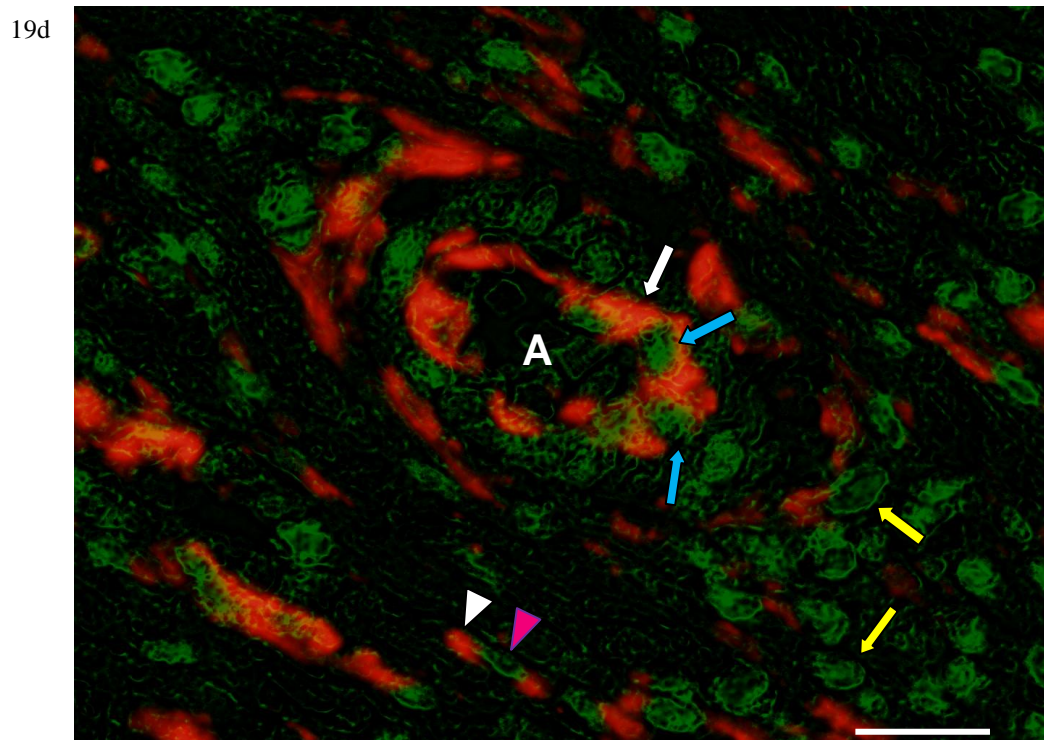
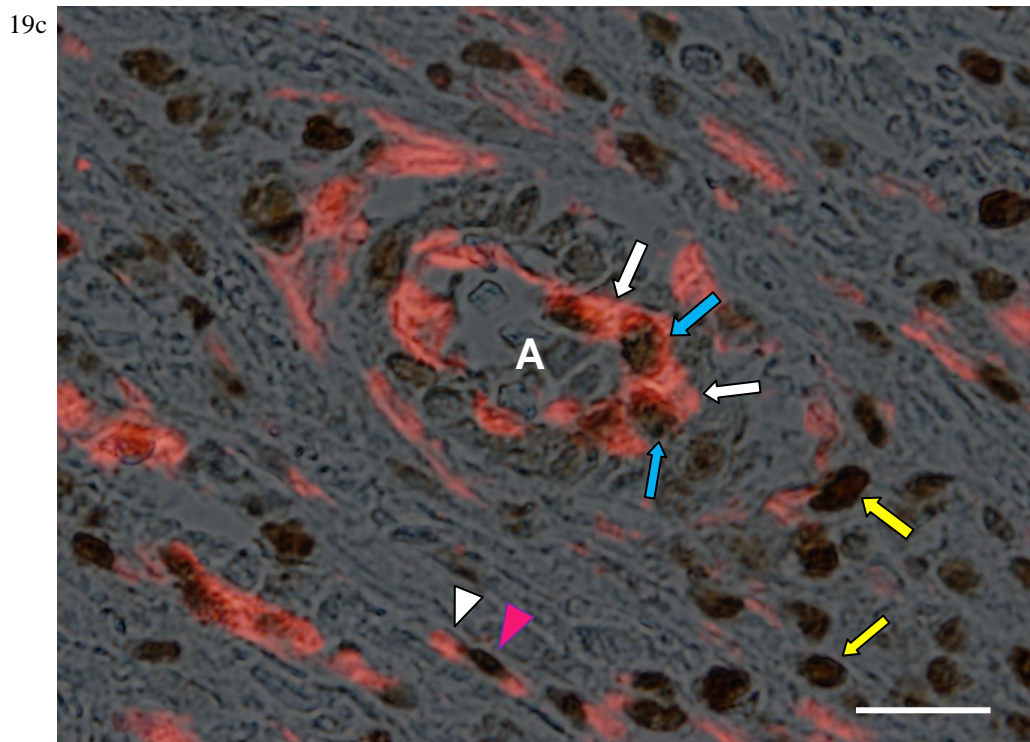


Obrázek č. 19c a 19d: Proložení předchozích fotografií (Obrázek č. 19a a 19b) pomocí programu Adobe Photoshop.

PCNA pozitivní jádra uvnitř arterioly (➡), jádro myofibroblastu (▶), jádra buněk trofoblastu (➡).

Cytoplasma nestin pozitivních endotelových buněk arterioly (➡), cytoplasma myofibroblastu (▷) Arteriola (A).

Měřítko: 40 µm.

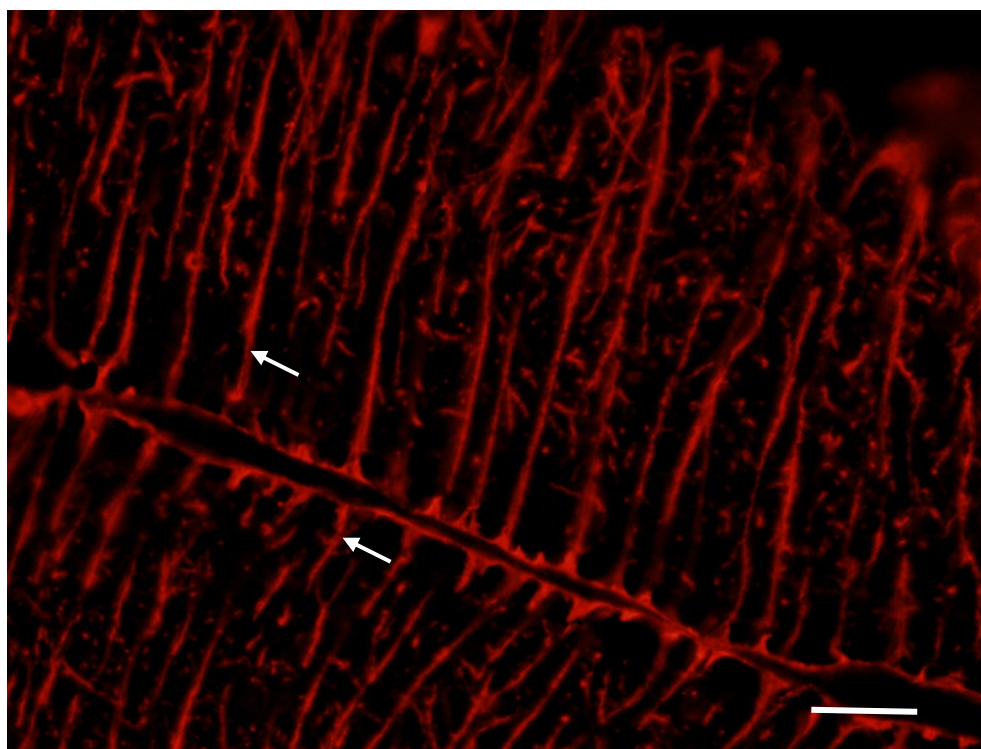


Obrázek č. 20: IHCH detekce GFAP v nervové tkáni.

Gestační věk 16 dnů. Detekce byla provedena pomocí systému LSAB - CSA.

Výběžky radiální glie (\Rightarrow).

Měřítko: 50 μm .

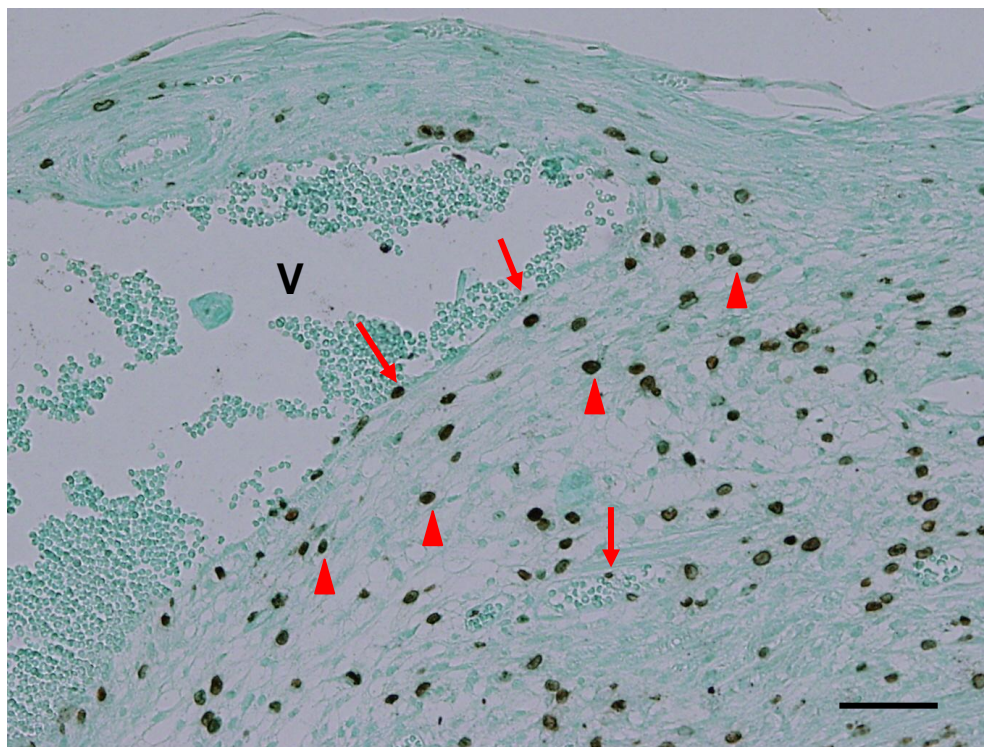


Obrázek č. 21: IHCH detekce dělících se buněk pomocí BrdU.

Gestační věk 11 dnů.

Buňky trofoblastu (▶), endotelové buňky (→), vena (V).

Měřítko: 100 μ m.



6 DISKUZE

Nestin je mnoha badateli považován za spolehlivého ukazatele neurálních kmenových buněk.

Nicméně nestin není exprimován všemi kmenovými buňkami, např. hematopoetickými a embryonálními kmenovými buňkami (Ramalho-Santos et al., 2002; Ivanova et al., 2002), ale jeho expresi můžeme pozorovat i u nediferencovaných buněk odvozených od svalové, nervové a jiné tkáně (Lendahl et al., 1990; Frederiksen et McKay, 1988; Hockfield et McKay, 1985; Mokřý et Němeček, 1998). V nediferencovaných buňkách je exprese nestinu přechodným stavem, po kterém následuje buněčná diferenciace. Nestin je postupně nahrazován zvýšenou expresí jiného typu intermediálního filamenta, například neurofilamenty v neurálních buňkách, desminem ve svalových buňkách nebo GFAP v astrocytech (Cattaneo et McKay, 1990).

Sugawara et al. (2002) studovali expresi nestinu v lidských gliomech a hemangioblastomech a navrhli nestin jako nádorový marker.

Z výsledků provedených studií plyne, že exprese nestinu není omezena na novotvořené endotelové buňky. Nestin se objevuje tam, kde dochází k angiogenezi, vaskularizaci a při regeneraci ve svalové lézi. Lze ho také považovat za spolehlivý marker neovaskularizace (Mokřý et al., 2004).

Pro experimentální část této práce jsme vybrali takové tkáně, ve kterých dochází k výše zmiňovaným jevům. Svoji pozornost jsme především soustředili na velké krevní cévy - artérie a vény, protože zde výskyt nestinu prozatím nikdo neprokázal.

Kombinovali jsme různé typy imunohistochemických metod, abychom zjistili, která z nich poskytne nejintenzivnější signál.

Průkaz exprese nestinu v krevních cévách, myofibroblastech a vyvíjející se míše

Silná imunoreaktivita byla pozorována v krevních cévách lidského plodu, slabý signál vykazovaly i buňky hladké svaloviny tunica media (Mokřý et al., 2004).

My jsme zachytili přítomnost nestinu ve velkých krevních cévách děložní stěny a děložních rohů pregnantní samice potkana v gestačním věku 11 dnů. Endotel artérie a vény exprimuje nestin různou intenzitou. Domníváme se, že tento rozdíl vyplývá z různých funkčních požadavků, kterým jsou artérie a vény vystaveny v průběhu

vaskularizace. Vény jsou poddajné, dokážou pojmout větší objem krve a nedochází u nich k tak výrazné přestavbě endotelu.

Krevní kapiláry a artérie děložních rohů vykazují silnou imunopozitivitu. Jedná se o tkáň, která rychle roste a je bohatě vaskularizována.

V regenerující kosterní svalovině byla pozorována exprese nestinu v novotvořených myoblastech a myotubulech (Čížková et al., 2009).

My jsme pozitivní signál zaznamenali v myofibroblastech. Myofibroblasty jsou buňky s dynamickým cytoskeletem, proto lze zde očekávat přítomnost nestinu.

Hockfield a McKay (1985) zaznamenali přítomnost nestin pozitivních buněk v neurální trubici potkaní embryonální tkáně o stáří 11 dnů, zatímco v pozdějším vývojovém stádiu CNS byla pozitivita omezena na buňky radiálních glií.

My jsme potvrdili přítomnost nestinu v neuroepitelu vyvíjející se míchy potkaní embryonální tkáně o stáří 11 dnů.

Pro detekci nestinu jsme použili detekční systém LSAB - HRP a LSAB - AP. Nevýhodou použití streptavidinu s navázanou křenovou peroxidázou může být vznik nespecifického pozadí. Avšak nám se podařilo utlumit endogenní peroxidázovou aktivitu tak, aby nepůsobila pozadí. Přesto jsme pro detekci použili i jiný detekční systém, jehož předností je nezávislost na endogenní peroxidázové aktivitě, a tudíž nepůsobí nespecifické barevné pozadí.

Dále jsme provedli detekci GFAP v nervové tkáni o stáří 16 dnů. GFAP pozitivitu vykazovaly výběžky radiálních glií. GFAP je jedním z nejstabilnějších markerů, proto jsme ho vybrali pro zavedení nové metody - LSAB - CSA. Amplifikace signálu pomocí tyramidů se jeví optimální pro identifikaci antigenů, které jsou ve tkáni vyjádřeny jen slabou intenzitou. Amplifikace umožní jednoznačný průkaz signálu.

V histopatologické diagnostice je detekce GFAP využívána např. pro určení, zda je nádor gliového původu (Reyaz et al., 2005).

Průkaz proliferujících buněk a exprese nestinu v proliferujících buňkách

K průkazu proliferační aktivity buněk slouží detekce PCNA a BrdU.

Mokrý et al. (2004) zachytili přítomnost proliferujících buněk v endotelu regenerujících cév po infarktu myokardu použitím monoklonální protilátky anti-PCNA, dále zachytili současnou přítomnost PCNA a nestin pozitivních endotelových buněk.

My jsme současnou přítomnost PCNA a nestinu prokazovali na sériově nakrájených parafinových řezech děložních rohů pregnantní samice potkana. K detekci jednotlivých antigenů jsme použili různé metody.

Přítomnost PCNA jsme prokázali v jádrech endotelových buněk artérie a vény. K detekci jsme použili systém EnVision s konjugovanou křenovou peroxidázou. Tento detekční systém jsme vybrali z důvodu několika výhod - zvýšená specifita, minimalizované nespecifické pozadí, snížení potřebných kroků.

Přítomnost nestinu v cytoplazmě endotelových buněk velkých cév jsme prokázali na dalším řezu v číslované sérii. K průkazu jsme použili detekční systém LSAB - CSA.

Pro důkaz současné exprese PCNA a nestinu se nám osvědčilo použití funkce “proložení fotografií” v programu Adobe Photoshop. Pro lepší orientaci ve snímku jsme PCNA pozitivním jádrům přiřadili zelenou barvu.

PCNA se tvoří endogenně, má dlouhý poločas rozpadu, proto ho mají i již vytvořené buňky a nelze detekcí toho antigenu přesně určit proliferační aktivitu buněk.

Pro zachycení právě probíhající proliferační aktivity slouží BrdU - thymidinový analog, který se po aplikaci okamžitě začlení do DNA namísto thymidinu v průběhu S-fáze DNA syntézy.

Detekci BrdU provedli **Mokrý a Němeček** (1994) v rostoucí placentě potkaních samic.

My jsme prokázali přítomnost BrdU v buňkách trofoblastu a endotelových buňkách.

Detekce BrdU sloužila zároveň pro zavedení nové metody.

7 ZÁVĚR

K průkazu nestinu a proliferujících buněk se nám osvědčily embryonální tkáně o stáří 11 a 16 dnů.

Osvědčily se nám tyto metody: LSAB – HRP, LSAB – AP, LSAB – CSA, EnVision – HRP a značení dělících se buněk pomocí BrdU.

Výsledky této práce dokládají, že nestin není přítomen jen v angiogenních kapilárách, ale i ve velkých cévách - artériích a vénách.

Úroveň exprese nestinu je vyšší v remodelovaných artériích než vénách.

V artériích exprimují nestin jak buňky endotelové, tak buňky hladké svaloviny.

Nestin hraje důležitou roli v arteriogenezi během remodelace cytoskeletu endotelových a hladkosvalových buněk.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. MOKRÝ, J., ČÍŽKOVÁ, D., FILIP, S., EHRMANN, J., ÖSTERREICHER, J., KOLÁŘ, Z., ENGLISH, D. (2004). *Nestin expression by newly formed human blood vessels*. Stem cells and development. 13: 658-664.
2. Cytoskelet, v: ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (1998). *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s.r.o., s. 513-518. ISBN 80-902906-2-0.
3. Cévní systém, v: MARIEB, E. N., MALLATT, J. (2005). *Anatomie lidského těla*. Brno: CP Books, a.s., s. 544-551. ISBN 80-251-0066-9.
4. MICHALCZYK, M.; ZIMAN, M. (2005). *Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation*. Histology and Histopathology. 20: 665 - 671.
5. Kardiovaskulární systém, v: KONRÁDOVÁ, V., UHLÍK, J., VAJNER, L. (1998). *Funkční histologie*. Praha: H+H, s. 146-156. ISBN 80-86022-35-8.
6. Srdce a cévy, v: MARTÍNEK, J., VACEK, Z. (2009). *Histologický atlas*. Praha: Grada Publishing, a.s., s. 11-12. ISBN 978-80-247-2393-8.
7. NEČAS, O., BÁRTEK, J., HAŠEK, J., STREIBLOVÁ, E., VIKLICKÝ, V. (1991). *Cytoskelet*. 1. vyd. 252 s., Praha: Československé akademie věd, ISBN 80-200-0116-6.
8. COOPER, G. M. and HAUSMAN, R. E. (2009). *The cell: A molecular approach*. 5. vyd., Washington, DC: ASM Press, s. 496 - 501. ISBN 978-0-87893-300-6.
9. VOGEL, W., GRUNEBACH, F., MESSAM, C. A., KANZ, L., BRUGGER, W. and BUHRING, H. J. (2003). *Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells*. Haematologica 88: 126-133.
10. TOMA, J. G., AKHAVAN, M., FERNANDES, K. J. L., BARNABÉ-HEIDER, F., SADIKOT, A., KAPLAN, D. R. and MILLER, F. D. (2001). *Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin*. Nature Cell Biol. 3: 778-784.

11. WIESE, C., ROLLETSCHEK, A., CZYZ, J., NAVARRETE-SANTOS, A., KANIA, G., BLYSZCZUK, P., ST-ONGE, L., BOHELER, K. B. and WOBUS, A. M. (2003). *Signals from mouse embryonic fibroblasts enable the generation of multipotent nestin plus cells from intestinal epithelium*. Eur. J. Cell Biol. 82: 45-46.
12. LI, L., MIGNONE, J., YANG, M., MATIC, M., PENMAN, S., ENIKOLOPOV, G. and HOFFMAN, R. M. (2003). *Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 9958-9961.
13. ZULEWSKI, H., ABRAHAM, E. J., GERLACH, M. J., DANIEL, P. B., MORITZ, W., MULLER, B., VALLEJO, M., THOMAS, M. K. and HABENER, J. F. (2001). *Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes*. Diabetes 50: 521-533.
14. RAMALHO-SANTOS, M., YOON, S., MATSUZAKI, Y., MULLIGAN, R. C. and MALTON, D. A. (2002). *"Stemness": Transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells*. Science 298: 597-600.
15. IVANOVA, N. B., DIMOS, J. T., SCHANIEL, C., HACKNEY, J. A., MOORE, K. A. and LEMISCHKA, I. R. (2002). *A stem cell molecular signature*. Science 298: 601-604.
16. LENDAHL, U., ZIMERMANN, L. B. and McKAY, R. D. G. (1990). *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein*. Cell 60: 585-595.
17. FREDERIKSEN, K., McKAY, R. D. G. (1998). *Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo*. J. Neurosci 8: 1144-1151.
18. HOCKFIELD, S., McKAY, R. D. G. (1985). *Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system*. J. Neurosci 5: 3310-3328.
19. MOKRÝ, J., NĚMEČEK, S. (1998). *Immunohistochemical detection of intermediate filament nestin*. Acta Med. (Hradec Králové) 41: 73-80.
20. CATTANEO, E. and McKAY, R. D. G. (1990). *Proliferation and differentiation of neural stem cells regulated by nerve growth factor*. Nature 347: 762-765.

21. SJÖBERG, G., JIANG, W.-Q., RINGERTZ, N.R., LENDAHL, U. and SEJERSEN, T. (1994). *Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy*. Exp. Cell Res. 214: 447-458.
22. TOHYAMA, T., LEE, V. M. Y., RORKE, L. B., MARVIN, M., McKAY, R. D. G. and TROJANOWSKI, J. Q. (1992). *Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells*. Lab. Invest. 66: 303-313.
23. FRISÉN, J., JOHANSSON, C. B., TÖRÖK, C., RISLING, M. and LENDAHL, U. (1995). *Rapid, widespread, and lonlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury*. J. Cell Biol 131: 453-464.
24. DAHLSTRAND, J., COLLINS, V. P. and LENDAHL, U. (1992). *Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors*. Cancer Res. 52: 5334-5341.
25. KIM, H. S., KANG, H. S., MESSAM, C. A., MIN, K. W. and PARK, C.S. (2002). *Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34*. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 10: 121-127.
26. SUGAWARA, K., KURIHARA, H., NEGISHI, M., SAITO, N., NAKAZATO, Y., SASAKI, T. and TAKEUCHI, T. (2002). *Nestin as a marker for porliferative endothelium in gliomas*. Lab. Invest. 82: 345-351.
27. WROBLEWSKI, J., ENGSTROM, M., EDWALL-ARVIDSON, C., SJÖBERG, G., SEJERSEN, T. and LENDHAL, U. (1997). *Distribution of nestin in the developing mouse limb bud in vivo and in micro-mass cultures of cells isolated from limb buds*. Differentiation 61: 151-159.
28. MOKRÝ, J., NĚMEČEK, S. (1998). *Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels in associated with expression of nestin in endothelial cells*. Folia Biol. (Prague) 44: 155-161.
29. MOKRÝ, J., NĚMEČEK, S. (1999). *Cerebral angiogenesis shows nestin expression in endothelial cells*. Gen. Physiol. Biophys. 18: 25-29.
30. DYLEVSKÝ, I., DRUGA R., MRÁZKOVÁ O. (2000). *Funkční anatomie člověka*, 1. vyd., Praha: Grada Publishing, spol. s r. o., s. 418-422, ISBN 80-7169-681-1.

31. ČIHÁK, R., DRUGA, R., GRIM, M. (2004). *Anatomie 3*, 2. upravené a doplněné vyd., Praha: Grada Publishing, a.s., s. 3-4, ISBN 80-247-1132-X.
32. DAHLSTRAND, J., ZIMMERMAN, L., MCKAY, R., LENDAHL, U. (1992). *Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments*. J. Cell Sci. 103: 589-597.
33. YASUI, Y., GOTO, H., MATSUI, S., MANSER, E., LIM, L., NAGATA, K., INAGAKI, M. (2001). *Protein kinases required for segregation of vimentin filaments in mitotic process*. Oncogene 20: 2868-2878.
34. YANG, J., CHENG, L., YAN, Y., BIAN, W., TOMOOKA, Y., SHIURBA, R., JING, N. (2001). *Mouse nestin c DNA cloning and protein expression in the cytoskeleton of transfected cells*. Biochim. Biophys. Acta 1520: 251-254.
35. COONS, A. H., CREECH, H. J., JONES, R. N. (1941). *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47: 200-202.
36. SINGER, S. J., SCHICK, A. F. (1961). *The properties of specific stains for electron microscopy prepared by conjugation of antibody molecules with ferritin*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 519-537.
37. NAKANE, P. K., PIERCE, G. B. (1966). *Enzyme-labelled antibodies: Preparation and application for the localization of antigens*. J. Histochem. Cytochem. 14: 929-931.
38. AVRAMES, S., URIEL, J. (1966). *Méthode de marquage d'antigenes et d'anticorps avec des enzymes at son application in immunodiffusion*. C. R. Hebd. Séans. Acad. Sci. (Paris) 262: 2543-2545
39. KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256: 495-497.
40. MOKRÝ, J. (1996). *Versatility of immunohistochemical reactions: comprehensive survey of detection systems*. Acta Med. (Hradec Králové) 39: 129-140.
41. BOSMAN, F. T., NIEUWENHUIJZEN-KRUSEMAN, A. (1979). *Clinical applications of the enzyme labeled antibody method. Immunoperoxidase methods in diagnostic hostopathology*. J. Histochem. Cytochem. 27: 1140-1147.

42. BOENISCH, T. Staining methods, in: NAISH, S. J., ed. (1989). *Immunohistochemical staining methods*. Carpinteria, California: DAKO Corporation. s 13-28.
43. CHOU, Y-H., ROSEVEAR, E., GOLDMAN, R. (1989). *Phosphorylation and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1885-1889.
44. CHOU, Y-H., BISCHOFF, J., BEACH D., GOLDMAN, R. (1990). *Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin*. Cell 62: 1063-1071.
45. CHOU, Y-H., KHUON, S., HERRMANN, H., GOLDMAN, R. (2003). *Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis*. Mol. Biol. Cell 14: 1468-1478.
46. ELIASSON, C., SAHLGREN, C., BERTHOLD, C., STAKEBERG, J., CELIS, J., BETSHOLTZ, C., ERIKSSON, J., PEKNY, M. (1999). *Intermediate filament protein partnership in astrocytes*. J. Biol. Chem. 274: 23996-24006.
47. FUCHS, E., WEBER, K. (1994). *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease*. Annu. Rev. Biochem. 63: 345-382.
48. HERMANN, H., AEBI, U. (2000). *Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics*. Curr. Opin. Cell Biol. 12: 79-90.
49. HIROKAWA, N., GLICKSMAN, N., WILLARD, M. (1984). *Organisation of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton*. J. Cell Biol. 98: 1523-1536.
50. HISANAGA, S., HIROKAWA, N. (1998). *Structure of the perinephral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing*. J. Mol. Biol. 202: 297-305.
51. MARVIN, M., DAHLSTRAND, J., LENDAHL, U., MCKAY, R. (1998). *A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice*. Exp. Cell Res. 248: 509-519.

52. SAHLGREN, C., MIKHAILOV, A., VAITTINEN, S., PALLARI, A., KALIMO, H., PANT, H., ERIKSSON, J. (2003). *Cdk5 regulates the organisation of nestin and its association with p35*. Mol. Cell Biol. 23: 5090-5106.
53. STEINERT, P., CHOU, Y.-H., PRAHLAD, V., PARRY, A., MAREKOV, L., WU, K., JANG, S.-I., GOLDMAN, R. (1999). *A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BKH-21 cells in nestin, a Type VI intermediate filament protein*. J. Biol. Chem. 274: 9881-9890.
54. Systém oběhový, v: JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., KELLY, R. O. (1997). *Základy histologie*. 7. vyd. v ČR 1., Jinočany: H&H, s. 204 - 218. ISBN 80-85787-37-7.
55. REYAZ, N., TAYYAB, M., KHAN, S. A., SIDDIQUE, T. (2005). *Correlation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) with grading of the neuroglial tumours*. Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan: JCPSP 15 (8): 472–475.
56. ČÍŽKOVÁ, D., SOUKUP, T., MOKRÝ, J. (2009). *Nestin expression reflects formation, revascularization and reinnervation of new myofibers in regenerating rat hind limb skeletal muscles*. Cells Tissues Organs. 189: 338-347.
57. LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., VOJTĚŠEK, B. (1997). *Imunohistochemické metody v biologii a bioptické diagnostice*. 1. vyd., Brno: Lékařská fakulta Masarykovy university v Brně, 147 s., ISBN 80-210-0620-X.
58. BERANOVÁ, M., TONAR, Z. *Principy a příklady imunohistochemie, Příručka pro studenty* [online]. 2002 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/komplet.html>.